



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**EFEITO DE CONCENTRAÇÃO SUBTERAPÊUTICA DE
VANCOMICINA SOBRE *Staphylococcus aureus*, NO
CONTEXTO DO TRATAMENTO DE BACTEREMIAS NO
PACIENTE EM HEMODIÁLISE.**

RODRIGO ALTOÉ CHAGAS

VITÓRIA

2016



Rodrigo Altoé Chagas

**EFEITO DE CONCENTRAÇÃO SUBTERAPÊUTICA DE
VANCOMICINA SOBRE *Staphylococcus aureus*, NO
CONTEXTO DO TRATAMENTO DE BACTEREMIAS NO
PACIENTE EM HEMODIÁLISE.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Espírito
Santo, como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas, do
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dra. Kênia Valéria dos Santos

Colaboradora: Prof. Dra. Lúcia Renata Meireles de Souza

VITÓRIA
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Chagas, Rodrigo Altoé, 1988 -
C426e Efeito da concentração subterapêutica de vancomicina
sobre *Staphylococcus aureus*, no contexto do tratamento de
bacteremias no paciente em hemodiálise / Rodrigo Altoé Chagas
– 2016.
69 f. : il.

Orientador: Kênia Valéria dos Santos.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Vancomicina. 2. Hemodiálise. 3. Virulência. I. Santos,
Kênia Valéria dos. II. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 615

Rodrigo Altoé Chagas

**EFEITO DE CONCENTRAÇÃO SUBTERAPÊUTICA DE VANCOMICINA
SOBRE *Staphylococcus aureus*, NO CONTEXTO DO TRATAMENTO DE
BACTEREMIAS NO PACIENTE EM HEMODIÁLISE.**

Trabalho de dissertação de mestrado aprovado em 20/06/2016 para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Espírito Santo.

BANCA EXAMINADORA:



Profª Drª. Vânia Lúcia da Silva / UFJF



Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck / UFES



Profª Drª. Kênia Valéria dos Santos (orientadora) / UFES

VITÓRIA

2016

Dedicatória

Dedico essa realização a minha família e principalmente a minha mãe, que com todo seu amor, preocupação e conselhos me trouxe até aqui. Obrigado por ser esse exemplo de perseverança, coragem e força.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pela força espiritual e amparo para realização deste trabalho.

À minha mãe Cecília, pelos conselhos e por sempre estar ao meu lado nos momentos difíceis. Por me educar e me dar valores para me tornar quem sou hoje.

Aos meus irmãos Rafael e Ana Carolina, pelo amor, carinho, ajuda e compreensão em todos os momentos difíceis da minha vida, sou eternamente grato.

À minha sobrinha Maria Eduarda, por iluminar minha vida e fazê-la mais feliz.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Kênia Valéria dos Santos, pela ótima orientação, acompanhamento, paciência e conhecimentos doados para a realização dessa pesquisa e para vida.

À Prof^a. Dr^a. Lúcia Renata Meireles de Souza pela colaboração e atenção para realização dessa pesquisa.

Ao professor Gustavo Rocha Leite pelo direcionamento nas análises estatísticas.

Aos Professores componentes da banca Dr. Ricardo Pinto Schuenck e Dr^a. Vania Lúcia da Silva pelas sugestões e disponibilidade de tempo para avaliação desta pesquisa.

A amiga e companheira de laboratório Cristiana de Souza e Silva, por todo auxílio nos experimentos, paciência e tempo doado.

À minha namorada Juliani, por ser amparo nos momentos difíceis e companheira de todas as horas.

Aos companheiros e amigos do Laboratório de Biologia de Microrganismos e Antimicrobianos (BioMA-Lab), Karina, Jessica, Pamela, Michel, Mariana e Louyse, pois sem eles esse trabalho não seria possível.

Às amigas Liamara, Érica, Simone, Heloísa, e Célia, funcionárias do laboratório de microbiologia, pela colaboração com a pesquisa e pela amizade.

À Priscila e Steveen pelo auxílio na coleta de sangue e colaboração na realização de hemogramas durante a pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), pela bolsa de estudos e financiamento do projeto.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCFAR), pela oportunidade de estudo.

RESUMO

Devido ao elevado índice de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) encontrados em infecções da corrente sanguínea (ICS) em pacientes submetidos a tratamento hemodialítico, vancomicina tem sido o antibiótico de escolha no tratamento empírico destas infecções. Falhas no ajuste de dose e intervalo de administração do fármaco fazem com que estes pacientes, muitas vezes, apresentem concentrações séricas de vancomicina abaixo do nível terapêutico ($<10\mu\text{g/mL}$). O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos de dose subterapêutica de vancomicina sobre alguns aspectos da fisiologia e de fatores de virulência do *S. aureus*. Linhagens de *S. aureus* com diferentes perfis de susceptibilidade à vancomicina foram expostas a dose subterapêutica do fármaco ($<10\mu\text{g/mL}$) em experimento de curva de morte. Em seguida, as linhagens bacterianas foram cultivadas na presença do fármaco durante 5 dias consecutivos em ágar Muller Hinton (MH) contendo um gradiente de vancomicina (0 a $10\mu\text{g/mL}$), simulando a terapia empírica padrão das ICS nos pacientes em hemodiálise. Uma cultura controle (sem exposição ao fármaco) das mesmas linhagens bacterianas foram incluídas em todos os experimentos. Ao final do quinto dia, as culturas foram avaliadas; (i) quanto à concentração inibitória mínima de vancomicina, daptomicina e oxacilina; (ii) quanto a sua capacidade de produção de biofilme e (iii) quanto à sua resistência à atividade bactericida do sangue total. Em conclusão, foi observado que a subdosagem de vancomicina não foi capaz de eliminar *S. aureus* e apresentou limitado efeito contra as linhagens em fase exponencial de crescimento. Entretanto, a subdosagem de vancomicina levou à alterações na fisiologia do microrganismo como: (i) a redução na susceptibilidade à vancomicina e daptomicina; (ii) aumento da resistência à ação bactericida do sistema imune e (iii) uma indução de respostas diferenciada de produção de biofilme entre os isolados clínicos de *S. aureus*. Estes achados estão de acordo com os relatos de falha terapêutica associada à subdosagens de vancomicina documentados na literatura.

Palavras-chave: vancomicina, dose subterapêutica, *S. aureus*, hemodiálise, virulência bacteriana.

ABSTRACT

In most patients undergoing hemodialysis treatment, due to the high rate of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin (MRSA) in bloodstream infections (BSI), vancomycin has been the antibiotic of choice for the empirical treatment of these infections. Failure in dose adjustment and drug dosing interval makes these patients often display a below therapeutic level ($<10\mu\text{g/mL}$) serum concentrations of vancomycin. The objective of this study was to investigate the effects of vancomycin subtherapeutic dose in some aspects of physiology and virulence factors of *S. aureus*. Strains of *S. aureus* with different susceptibility to vancomycin were exposed to subtherapeutic dose of the drug ($<10\text{mg / ml}$) to kill curve experiment. Then, the bacterial strains were cultured in the presence of drug for 5 consecutive days on Müller Hinton agar containing (0 a $10\mu\text{g/mL}$), simulating the pattern empiric therapy of BSI in hemodialysis patients. Control cultures (without drug exposure) of the same bacterial strains were included in all experiments. At the end of the fifth day, the cultures were evaluated (i) for the minimum inhibitory concentration of vancomycin, daptomycin and oxacillin; (ii) biofilm production capacity and (iii) resistance to bactericidal activity of whole blood. In conclusion we reported that vancomycin overdose was not able to eliminat *S. aureus* and had limited effect against strains in exponential phase of growth. However, overdose of vancomycin has led to changes in the physiology of the microorganism as: (i) reduced susceptibility to vancomycin and daptomycin; (ii) increased resistance to the bactericidal action of the immune system and (iii) induction of a different response biofilm production among clinical isolates of *S. aureus*. These findings are consistent with therapeutic failure reports associated with underdosing vancomycin documented in the literature.

Keywords: vancomycin, subtherapeutic dose, *S. aureus*, hemodialysis, bacterial virulence.

Lista de ilustrações

Figura 1: Esquema de montagem da placa gradiente.....	35
Figura 2: Placa com gradiente de concentração de vancomicina (0-10 µg/mL) exibindo crescimento da linhagem de <i>S. aureus</i>	35
Figura3: Microplaca de poliestireno de 96 poços. Microdiluição em Caldo.....	39
Figura 4: Curvas de crescimento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 e ATCC 33591 realizadas após cultivo das linhagens na presença de dose subterapêutica de vancomicina.....	42
Figura 5: Curvas de morte de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 e ATCC 33591.....	44
Figura 6: Variação da CIM de vancomicina (A), daptomicina (B) e oxacilina (C) após o cultivo de <i>S. aureus</i> (n=21) por 5 dias consecutivos em placas contendo gradiente de concentração de vancomicina.....	47
Figura 7: Produção de biofilme por amostras de <i>S. aureus</i> (n=21) após exposição a dose subterapêutica de vancomicina por 5 dias consecutivos.....	51
Figura 8: Produção de biofilme aumentada (verde) ou diminuída (branco) após exposição de amostras clínicas de <i>S. aureus</i> (n=9) a dose subterapêutica de vancomicina por 5 dias consecutivos.....	51
Figura 9: Atividade bactericida do sangue total contra <i>S. aureus</i> cultivado por 5 dias consecutivos em meio contendo subdosagem de vancomicina.....	56
Figura 10: Atividade bactericida do sangue total contra <i>S. aureus</i> cultivado por 5 dias consecutivos em meio contendo subdosagem de vancomicina. (análise individual).....	57

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS:

ATCC - American Type Culture Collection

Agr- Accessory Gene Regulator

Agar MH - Ágar Muller Hinton

AUC/CIM- Área sob a curva de concentração em 24h sobre a CIM

Caldo BHI - Brain Heart Infusion Broth

CAMHB - Mueller Hinton II Broth- cátion adjusted

Caldo TSB-G – Trypticase Soy Broth suplementado com 0,25% de glicose

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CVC - Cateter Venoso Central

CSM - Concentração Sérica Mínima

DRC -Doença Renal Crônica

DO - Densidade Ótica

FAV - Fístula arteriovenosa

HBSS - Hank'sBalanced Salt Solution

hVISA- *Staphylococcus aureus* com heterorresistência intermediária à vancomicina

ICS - Infecções da corrente sanguínea

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

NHANES - National Health and Nutrition Examination Survey

PBS - Phosphate Buffered Saline

PMN - Polimorfonucleares

S. aureus - *Staphylococcus aureus*

SCCmec - Cassete Cromossômico Estafilocócico

TSST-1- Toxina da Síndrome do Choque Tóxico

TRS - Terapia Renal Substitutiva

UFC - Unidade Formadora de Colônias

VISA- *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. Doença Renal Crônica (DRC)	19
2.2. Hemodiálise	20
2.3. Fatores de risco e epidemiologia das infecções no paciente em hemodiálise	20
2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	22
2.4.1. Infecções causadas por <i>S. aureus</i> no paciente em hemodiálise	23
2.5. Vancomicina	25
2.6. Consequências da subdosagem de antibióticos	28
2.6.1. Seleção de linhagens resistentes	28
2.6.2. Morfologia bacteriana	28
2.6.3. Interação patógeno-hospedeiros (fatores virulência)	29
3. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivo Geral:	33
3.2. Objetivos Específicos:.....	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. Amostras bacterianas:	34
4.2. Exposição das amostras a doses subterapêuticas de vancomicina:	34
4.3. Curva de Crescimento:	36
4.4. Curva de Morte:	37
4.5. Determinação da susceptibilidade à vancomicina, oxacilina e daptomicina após subcultivos nas placas gradiente:	37
4.6. Ensaio de Biofilme:	39
4.7. Ensaio de atividade bactericida do sangue total:	40
4.7.1. Preparo do inóculo	40
4.7.2. Coleta de sangue total	41
4.7.3. Ensaio da atividade bactericida de sangue total.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:	42
5.1. Curva de Crescimento	42
5.2. Subdosagem de vancomicina apresenta limitado efeito contra as linhagens de <i>S. aureus</i> em fase exponencial de crescimento.....	43
5.3. Subdosagem de vancomicina diminui a sensibilidade de <i>S. aureus</i> à vancomicina e daptomicina, mas não à oxacilina	45

5.4. Dose subterapêutica de vancomicina induz resposta diferenciada de produção de biofilme em <i>S. aureus</i>	50
5.5. Subdosagem de vancomicina aumenta a resistência de <i>S. aureus</i> a ação bactericida dos leucócitos.	53
6. CONCLUSÕES:.....	59
7. REFERÊNCIAS:.....	60

1. INTRODUÇÃO

Pacientes com doença renal crônica (DRC) em tratamento hemodialítico são particularmente vulneráveis à infecção por *Staphylococcus aureus*, sendo o acesso vascular uma importante porta de entrada para o microrganismo (VANDECASTEELE; BOELAERT; DE VRIESE, 2009; LI et al., 2009). Dados recentes mostram que a incidência de episódios de bacteremias em pacientes em tratamento hemodialítico na Grande Vitória foi de 28% e 15% nos dois últimos anos. Como esperado, a espécie mais frequentemente isolada foi *S. aureus* (24%), com 17% das linhagens resistentes a meticilina (MRSA) (VITÓRIA, 2015). Estes pacientes apresentam, naturalmente, maior risco de infecção e/ou colonização por MRSA, devido às repetidas punções para o acesso de hemodiálise, principalmente em se tratando de cateter venoso central (CVC) de longa permanência, os prolongados tratamentos com antimicrobianos, e à imunossupressão (LAI et al., 2011). Por este motivo, estes pacientes são tratados, empiricamente, com vancomicina, um glicopeptídeo com atividade contra bactérias Gram-positivas, em casos de suspeita de bacteremias (ELEFTHERIADIS et al., 2011). Revelando uma tendência mundial, as linhagens de *S. aureus* recuperadas de bacteremias verdadeiras de pacientes em hemodiálise na Grande Vitória tem mostrado diminuição da sensibilidade a este glicopeptídeo (STEINKRAUS, 2007, GOULD, 2008; CHANG et al, 2015), com concentração inibitória mínima (CIM) variando entre 0,5 e 2 µg/mL (CIM₉₀ e CIM₅₀ de 2 e 1 µg/mL, respectivamente) (VITÓRIA, 2015), embora ainda categorizados como sensíveis.

Vancomicina é administrada por via intravenosa e eliminada primeiramente por via renal (80% a 90% após 24 horas). Sua meia vida ($\frac{1}{2}$) em um paciente adulto normal é de 4 a 8 horas, no entanto, em pacientes com a função glomerular comprometida, este tempo pode aumentar para 7 a 12 dias. Esta longa $\frac{1}{2}$ vida permite a administração de vancomicina em dose única semanal no paciente em hemodiálise, facilitando a adesão do paciente ao tratamento. O monitoramento da concentração sérica é extremamente

recomendável nestes pacientes, para que se mantenham níveis séricos compatíveis com a atividade bactericida do fármaco e que previnam efeitos tóxicos (nefro e ototoxicidade) (SHULER et al., 1996, RYBAK, 2006; PACIFICI et al., 2012). Dentre os fatores que podem interferir nos níveis séricos de vancomicina, influenciando em sua eliminação, citam-se função renal residual, tipo de membrana dialítica e forma de administração do antibiótico (durante ou após a diálise) (VANDECASTEELE AND VRIESE, 2011).

Entretanto, o que se tem observado é que subdosagens de vancomicina (definidas aqui por concentrações séricas $<10 \mu\text{g/mL}$) tem ocorrido com frequência em pacientes em tratamento hemodialítico (ISOPPO, 2013). De fato, recentes dados locais revelaram concentrações séricas mínimas - CSM (dosagens realizadas imediatamente antes da próxima dose do antibiótico) abaixo de $10 \mu\text{g/mL}$ em 90% dos pacientes em tratamento hemodialítico, na Grande Vitória (VITÓRIA, 2015) e em 86% dos pacientes em um hospital no estado de São Paulo (MARENGO et al., 2010).

Subdosagens de vancomicina estão relacionadas com falha terapêutica e seleção de clones resistentes (MOISE-BRODER et al, 2004). Estudos de Sakoulas e colaboradores (2006), e Howden e colaboradores (2004), mostraram uma associação entre CSM de vancomicina menores que $10 \mu\text{g/mL}$ e ineficácia do tratamento, que pode potencialmente promover emergência de linhagens resistentes. De fato, dados recentes de nosso grupo de pesquisa mostraram falha terapêutica em 42% dos pacientes com bacteremias por *S. aureus* com CIM = $2 \mu\text{g/mL}$ enquanto para pacientes com isolados com CIMs de 0,5 e $1 \mu\text{g/mL}$, estes índices foram de 22 e 27%, respectivamente (VITÓRIA, 2015).

A associação entre subdosagens de vancomicina e ineficácia do tratamento pode também estar relacionada com atributos de virulência do microrganismo, que podem estar sendo alterados pelas baixas concentrações do fármaco. Baixas concentrações de alguns antimicrobianos têm sido reportadas por estimular alterações nos microrganismos, as quais podem facilitar a adaptação bacteriana a diferentes tipos de estresses (THI et al., 2011). As concentrações subterapêuticas dos antimicrobianos, embora não

eliminam o microrganismo infectante, são capazes de modificar suas características físicoquímicas e sua morfologia, além de interferir em importantes propriedades bacterianas, como a capacidade de adesão, a hidrofobicidade da superfície celular, a produção de fímbrias, a motilidade e a interação patógeno-hospedeiro (BRAGA, 1994; BRAGA *et al.*, 1999; BRAGA *et al.*, 2002; BRAGA & DAL, 2002a; BRAGA & DAL, 2002b; BRAGA & PIATTI, 1993; SHAPIRO, 2015).

A formação de biofilmes tem papel crítico no desenvolvimento de infecções de corrente sanguínea, principalmente por MRSA. O tratamento dessas infecções é um grande desafio, pois bactérias crescendo em biofilmes são significativamente mais resistentes a agentes antimicrobianos e à ação do sistema imune do hospedeiro (ABDELHADY *et al.*, 2014).

A resistência à fagocitose pode ser outro fator relacionado às falhas terapêuticas, uma vez que a primeira linha de defesa do organismo contra as bacteremias é a atividade antimicrobiana de fagócitos presentes no sangue. Em geral, a capacidade de *S. aureus* de causar doenças em humanos é possibilitada pela evasão deste microrganismo das defesas inatas do hospedeiro, que inclui a resistência aos peptídeos antimicrobianos e à morte por leucócitos fagocitários (DELEO *et al.*, 2009). Esse microrganismo tem um repertório impressionante de fatores de evasão do sistema imune (FOSTER, 2005), podendo se esconder do reconhecimento dos fagócitos através da produção de polissacarídeos capsulares ou biofilme. Após a fagocitose, as bactérias também utilizam mecanismos para diminuir a eficiência dos mecanismos antimicrobianos podendo também, muitas vezes, produzir toxinas que lisam os fagócitos (GRESHAM *et al.*, 2000, VOYICH *et al.*, 2005; FOSTER *et al.*, 2014).

Entretanto, apesar do disseminado uso clínico de vancomicina no controle de infecções estafilocócicas, e da reconhecida dificuldade em se alcançar níveis séricos mínimos que assegurem a atividade bactericida desta droga, principalmente nos pacientes em hemodiálise, limitada informação existe acerca dos efeitos de doses subinibitórias e/ou subterapêuticas deste glicopeptídeo sobre a fisiologia de *Staphylococcus* spp.

Assim, considerando a carência de informações sobre os fenômenos envolvidos na exposição de *S. aureus* à doses subterapêuticas de vancomicina; os potenciais efeitos desta exposição sobre a relação patógeno-hospedeiro e a constância de doses subterapêuticas deste glicopeptídeo, especialmente no paciente com doença renal crônica e em tratamento de hemodiálise, pretendeu-se, com esta proposta, gerar conhecimentos que direcionem para a “conduta terapêutica ideal”, e que propiciem a redução dos agravos potenciais para os pacientes, além de redução do risco de surgimento de resistência bacteriana.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Doença Renal Crônica (DRC)

A DRC se constitui por alterações na estrutura ou função dos rins, com a duração de três meses ou mais, provocando perda progressiva e irreversível da função renal. Nessa patologia, os rins perdem a função glomerular, tubular e endócrina, tendo assim o seu funcionamento prejudicado. A DRC é um problema de saúde pública mundial, com grande aumento em sua incidência e prevalência, sendo responsável por aumento do risco de doenças cardiovasculares e morte prematura (NKF, 2002; LEVEY et al., 2005; NEGRETTI; MENDONÇA; CESAR, 2014).

Pacientes com DRC tem risco elevado de desenvolver doenças cardiovasculares, sendo que esta é a principal causa de morte entre pacientes em Hemodiálise, contando mais de 40% do motivo de internações e mais de 50% da causa de mortes (LOCATELLI et al., 2003).

Recentemente a *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), estimou que cerca de 13% da população adulta dos EUA possui DRC. O número de pacientes com insuficiência renal (estágio final da DRC) tratados por diálise e transplantes, aumentou dramaticamente neste mesmo país com 209000 casos em 1991 para 472000 em 2004 (CORESH et al., 2007).

O índice de mortalidade de pacientes com DRC que fazem tratamento dialítico é aproximadamente de 16% por ano no Brasil (BARROS et al., 2006, SMELTZER et al., 2011).

Hipertensão e a diabetes são os principais fatores de risco para o desenvolvimento de DRC, esse risco pode dobrar em pessoas com mais de 60 anos. Em dados relatados pela NHANES, a prevalência de DRC em pacientes com idade acima de 70 anos (1999 a 2004) era de 46,8% enquanto em pacientes com idade entre 40-59 anos era de 6,71%. Tais fatores de risco são responsáveis por cerca de 70% dos casos de insuficiência renal. Pacientes nesse nível da DRC necessitam de terapia renal substitutiva (TRS), podendo

ser feita através de hemodiálise, diálise peritoneal ou até transplante renal (STEVENSON; VISWANATHAN; WEINER, 2010).

2.2. Hemodiálise

O processo de depuração do sangue, através da filtração de substâncias indesejáveis como uréia e creatinina é chamado hemodiálise, procedimento feito quando o mecanismo de filtração dos rins do paciente está deficiente (NASCIMENTO; MARQUES, 2005).

O acesso vascular para proceder a hemodiálise pode ser feito por fistula arteriovenosa (FAV), grafts arteriovenosos constituído de materiais sintéticos ou CVCs. A fístula é o método mais seguro e preferido, pois as taxas de complicações e despesas com pacientes com fístulas é menor do que aqueles com enxertos sintéticos ou CVCs (DEMBER et al., 2014).

O aparelho que procede a hemodiálise recebe o sangue do paciente através de um acesso vascular. O sangue é impulsionado por uma bomba até o dialisador (filtro). No dialisador o sangue entra em contato com uma solução de diálise através de uma membrana semipermeável que extrai o líquido e as toxinas em excesso e devolve o sangue filtrado para o paciente pelo acesso vascular (SBN, 2015).

FAV pode ser feita com as veias do paciente ou com materiais sintéticos. É conduzida por uma cirurgia no braço ou na perna, sendo feita uma ligação entre uma artéria de pequeno calibre e uma veia, no intuito de tornar a veia mais calibrosa. A fistula deve ser feita de preferência de 2 a 3 meses antes do início da hemodiálise (SBN, 2015). O CVC é colocado em uma veia no pescoço, virilha ou tórax, sendo uma opção temporária para pacientes que ainda não possuem fistula e necessitam da hemodiálise (SBN, 2015).

2.3. Fatores de risco e epidemiologia das infecções no paciente em hemodiálise

A segunda maior causa de morte entre os pacientes submetidos à hemodiálise são as infecções, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (BLOEMBERGEN; PORT, 1996; NASSAR; AYUS, 2001).

O acesso vascular em hemodiálise é feito através FAV ou por CVC, sendo a fístula considerada a melhor opção. O risco de bacteremia em pacientes que utilizam CVC é aproximadamente 7,64 vezes maior do que os pacientes que utilizam fístulas (BISIWE et al., 2015).

Na ausência da possibilidade de se executar a hemodiálise através de fístula e é necessário acesso imediato à circulação a opção é utilizar CVC (DOGRA et al., 2002; SAXENA; PANBOTRA, 2005)

Nos EUA, cerca de 19% de novos pacientes submetidos à hemodiálise são sujeitos a utilização de CVC, e aproximadamente 70% desses continuam usando após 60 dias, sendo que o principal fator que limita o uso desses dispositivos é a ocorrência de infecções (DOGRA et al., 2002).

Em estudo realizado na região Centro-oeste do Brasil, com pacientes apresentando DRC submetidos à hemodiálise por CVC, foi observado uma taxa de infecção de corrente sanguínea de 63,3% (GAUNA, 2013).

Entre os pacientes em hemodiálise a taxa anual de internações por bacteremia ou septicemia, em 2010, foi de 116 a cada 1000 pacientes (COLLINS et al., 2013). Em estudo conduzido nos EUA, pacientes em hemodiálise apresentaram altos índices de infecções, sendo que entre os anos de 1994 e 2009 houve aumento de 30,6% no numero de casos (LAFRANCE et al., 2014).

Infecções relacionadas a cateteres estão associadas à alta morbidade e mortalidade e custos adicionais no tratamento dos pacientes (DOGRA et al., 2002).

Bacteremia causada por cocos Gram-positivos é comum em pacientes submetidos à hemodiálise. Os principais causadores de infecções em acessos vasculares geralmente são, em ordem decrescente de freqüência, os *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase-negativa, bacilos Gram negativos outros cocos Gram positivos (incluindo *enterococcus*) e fungos (TAYLOR et al, 2002; ABBOTT; AGODOA, 2001).

Em estudo realizado no Hospital Universitário da Universidade Federal de São Paulo, em 2013, foram isolados 240 microorganismos de culturas de 94 pacientes em hemodiálise por CVC que apresentaram infecção de corrente sanguínea. Os Gram-positivos foram mais freqüentes sendo dentre eles o *S. aureus* mais prevalente, com 76%. Dentre os Gram-negativos, os mais freqüentes foram *Pseudomonas aeruginosa* com 40% e o *Acinetobacter baumannii* com 34%. Os fungos foram menos prevalentes, com 13% do total de infecções, sendo *Cândida* spp. mais frequente dentre eles, com total de 73% (ESMANHOTO et al., 2013).

2.4. *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae*, sendo composto por 48 espécies e 26 subespécies. Estes microrganismos apresentam-se como cocos Gram positivos, com 0,5 –1,5µm de diâmetro. Suas células ocorrem sozinhas, em pares, tétrades, pequenas cadeias (3 ou 4 células) ou irregulares na forma de cachos. Estas bactérias são imóveis, resistentes à bacitracina, não formadora de esporos, normalmente catalase positivos (com exceção das espécies *Staphylococcus aureus* sub sp. *anaerobius* e *S. saccharolyticus*, que são catalase negativos) e anaeróbios facultativos. Geralmente, toleram concentrações de até 10% de NaCl com temperatura ótima de crescimento entre 30°C e 37°C (KONEMAN, 2008, EUZEBY, 2014).

Entre as espécies do gênero *Staphylococcus*, a de maior interesse médico é o *S. aureus*, que está frequentemente relacionado com diversas infecções graves em seres humanos, tanto de origem hospitalar, quanto adquirida na comunidade.

Esse microrganismo pode colonizar tecidos humanos de forma assintomática e duradoura, ou incorporar-se em superfícies inertes formando biofilmes. *S. aureus* pode sobreviver em circunstâncias extremas no hospedeiro humano, assim como no ambiente e em animais. Isso é possível devido à produção de várias proteínas de superfície envolvidas na colonização do hospedeiro, enzimas que auxiliam na invasão de tecidos, fatores de escape

do sistema imune (como a cápsula) e a produção de muitas toxinas. Tais fatores de virulência fazem deste um dos patógenos mais perigosos aos seres humanos (VANDECASTEELE; BOELAERT; DE VRIESE, 2009).

Fatores de virulência de *S. aureus* como o polissacarídeo capsular, podem comprometer o acesso de células fagocíticas, por meio da inibição da ligação dos fatores do sistema complemento e dos anticorpos à célula bacteriana. A estafiloquinase extracelular (SAK), que ativa o plasminogênio e cliva IgG e C3b também inibe a opsonofagocitose. *S. aureus* possui, também, a proteína A que se liga à IgG nos domínios de ligação Fc impedindo a ligação aos receptores de Fc nas células fagocíticas. Com a proteína de ligação ao fibrinogênio (EFB) *S. aureus* se liga ao factor do complemento C3 e bloqueia a sua deposição sobre a superfície das células bacterianas. O fator de aglutinação (ClfA) que também é um importante fator de virulência de *S. aureus* promove a ligação da cadeia γ de fibrinogênio, camuflando a célula bacteriana (FOSTER, 2005).

S. aureus é uma das espécies bacterianas mais frequentemente associadas com infecções mediadas pelo biofilme. Ele pode ser encontrado como um comensal na pele, narinas e mucosas, mas em algumas situações, pode tornar-se a fonte de infecções relacionadas com o biofilme. Biofilmes de *S. aureus* podem ocorrer em tecidos do hospedeiro, tais como válvulas cardíacas (endocardite) e tecido ósseo (osteomielite), sendo mais freqüentemente em dispositivos médicos como cateteres, acarretando infecções crônicas de difícil tratamento (DASTGHEYB et al., 2015). Formação de biofilmes em superfícies de implantes aumenta a resistência bacteriana a agentes antimicrobianos e conduz ao fracasso das terapias antimicrobianas convencionais. Antimicrobianos como vancomicina se difundem lentamente para as camadas interiores de biofilmes e a exposição gradual das células bacterianas a baixas concentrações do fármaco facilita o desenvolvimento de resistência (ANTUNES et al., 2011).

2.4.1. Infecções causadas por *S. aureus* no paciente em hemodiálise

S. aureus é a maior causa de infecções adquiridas na comunidade e hospitalares, incluindo bacteremias, endocardites, osteomielites, abscessos metastáticos e infecções de feridas (SHINEFIELD et al., 2002).

Pessoas em hemodiálise estão particularmente vulneráveis a infecção por *S. aureus*, sendo o acesso vascular uma enorme porta de entrada para o microrganismo (VANDECASTEELE; BOELAERT; DE VRIESE, 2009). Uma prova disto é a taxa anual de incidência de bacteremia por *S. aureus*, que chega a 27% em pacientes em hemodiálise (LI et al., 2009).

Em estudo realizado por nosso grupo de pesquisa em clínicas de Hemodiálise da grande Vitória/ES, a incidência de episódios de bacteremia nos períodos entre novembro de 2012 a novembro de 2013 foi de 28,5 episódios /100 pacientes e novembro de 2013 a novembro de 2014 foi de 15 episódios/100 pacientes, sendo a espécie mais frequente o *S. aureus* com 24% de todos os casos, e destes, 17% eram MRSA (VITÓRIA, 2015).

Infecções causadas por MRSA são cada vez mais comuns, representando 40% a 70% de todas as infecções causadas por estafilococos no mundo (LUCET et al., 2003). Na Europa, a proporção de MRSA isolado de pacientes infectados por *S. aureus* alcançou mais de 50% em 2011 (DULON et al., 2014).

Pacientes com DRC estão em grande risco de infecção e/ou colonização por MRSA, pois além do fato de seu sistema imune estar comprometido, eles são repetidamente expostos a procedimentos médicos invasivos (punções para acesso de hemodiálise) e recebem prolongados tratamentos com antimicrobianos. O uso de acessos venosos prolongados especialmente via CVC é um fator de risco para esse tipo de infecção (LAI et al., 2011).

A incidência de infecção por MRSA em pacientes em hemodiálise nos EUA é cerca de 100 vezes maior do que o da população em geral. Em 2010, aproximadamente 15700 infecções por este patógeno ocorreram entre os pacientes em hemodiálise (LAI et al., 2011).

2.5. Vancomicina

Vancomicina foi o primeiro antibiótico glicopeptídeo desenvolvido para uso clínico, com atividade contra bactérias Gram positivas. O efeito primário dos glicopeptídeos é a complexação com as cadeias peptídicas não ligadas e bloqueio da transpeptidação, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana, podendo também inibir a síntese de RNA e da membrana citoplasmática de *S. aureus* (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Devido ao alto risco de infecção por MRSA apresentado pelos pacientes em hemodiálise, a vancomicina é utilizada empiricamente para fazer a cobertura desse microrganismo em casos de pendência de resultados de culturas (ELEFTHERIADIS et al., 2011).

Vancomicina não é muito bem absorvida por via oral, sendo então utilizada a via intravenosa. A eliminação ocorre primeiramente por via renal, com 80% a 90% da sua concentração recuperado na urina após 24 horas da sua administração. Vancomicina penetra na maioria dos tecidos, no entanto as concentrações obtidas são variáveis dependendo do local. Algumas vezes é necessário certo grau de inflamação para que ocorra a penetração do antibiótico, como acontece com as meninges (RYBAK, 2006).

O tempo de meia vida em um paciente adulto normal é de 4 a 8 horas, no entanto em pacientes com a função glomerular comprometida este tempo pode aumentar para 7 a 12 dias, fazendo-se necessário o ajuste de dose para tais pacientes. O objetivo da adequação de doses é manter a eficácia da droga, com o mínimo de efeito tóxico possível. Esse ajuste é feito de acordo com a droga usada e o grau de insuficiência renal do paciente. No entanto, para cada nível de perda da função renal há grande variação de doses e intervalos recomendados, sem contar as diferenças individuais de cada paciente (SHULER et al., 1996).

Uma variedade de parâmetros de avaliação da farmacocinética e farmacodinâmica de vancomicina têm sido propostas, sendo a mais recomendada contra espécies de estafilococos, a área sob a curva de

concentração em 24h sobre a CIM (AUC/CIM). O alvo recomendado para se alcançar efetividade terapêutica com vancomicina é AUC/CIM ≥ 400 que, para linhagens com CIM de 1 $\mu\text{g/mL}$, requer uma concentração sérica mínima (CSM) de 15 $\mu\text{g/mL}$. O consenso é que a CSM deve ser mantida em torno de 10 $\mu\text{g/mL}$ para se evitar o desenvolvimento de linhagens de *S. aureus* resistentes a vancomicina e entre 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$ para o tratamento de infecções graves como meningites, osteomielites, endocardite e bacteremia (RYBAK et al., 2009). No entanto, estas dosagens mais elevadas podem aumentar o risco de nefrotoxicidade, especialmente importante no paciente com alguma função renal, e ototoxicidade (WONG-BERINGER et al., 2011; VAN HAL; PATERSON; LODISE, 2013).

Dentre os fatores que podem interferir nos níveis séricos de vancomicina cita-se função renal residual, tipo de membrana dialítica, e a forma de administração do antibiótico (durante ou após a diálise), dentre outros. Esses fatores dificultam o controle dos níveis de antibiótico no soro do paciente, por influenciarem na remoção e eliminação da vancomicina (VANDECASTEELE AND VRIESE, 2011).

Subdosagens de vancomicina, com níveis séricos mínimos $\leq 10 \mu\text{g/mL}$, estão relacionadas a risco de falha no tratamento e pode promover o aparecimento de linhagens resistentes a este antibiótico (SAKOULAS, 2006). Alguns estudos orientam a utilização de altas doses alvo para infecções graves com MRSA, sendo indicada a concentração mínima no soro de 15-20 $\mu\text{g/mL}$ para a cobertura de linhagens com sensibilidade reduzida à vancomicina. Essa dosagem tem sido amplamente empregada na prática clínica, no entanto pode estar associada a aumento no risco de nefrotoxicidade (especialmente no paciente com alguma função renal) e ototoxicidade; (WONG-BERINGER et al., 2011; VAN HAL; PATERSON; LODISE, 2013).

É notável que subdosagens de vancomicina são concentrações de 10 a 20x maiores que as CIMs para os isolados de *S. aureus*. Assim, para a compreensão do fenômeno de seleção de clones resistentes nestas condições é necessário o conhecimento da cinética de ação de vancomicina sobre estes microrganismos. Vancomicina exibe atividade antibacteriana dependente do tempo e também da dose contra estafilococos. O período de tempo em que os

níveis no soro excedem a CIM seria o parâmetro farmacodinâmico que mais fortemente correlaciona com a sua eficácia. Este tipo de abordagem pode garantir a presença de concentrações suprainibitórias durante todo o intervalo entre doses. Entretanto, a consideração apenas desta hipótese pode levar a estratégias de dosagem inadequadas, considerando que AUC/CIM é o parâmetro farmacodinâmico que pode melhor prever a eficácia clínica de vancomicina e deve ser levado em conta quando a dosagem do fármaco for decidida (RYBAK, 2006; PEA et al., 2009). Sabe-se que concentrações muito abaixo da CIM reduzem a taxa de crescimento de linhagens sensíveis (15% mais lento) sem causar efeito sobre linhagens resistentes, sugerindo que estas últimas são fortemente selecionadas (GULLBERG, 2011). De fato, *S. aureus* tem mostrado uma tendência notável para desenvolver rapidamente resistência aos antimicrobianos, com destaque para o surgimento de MRSA, que geralmente também são resistentes a vários outros beta-lactâmicos. Vancomicina ainda tem excelente cobertura contra estes isolados, embora seu crescente uso tenha, previsivelmente, levado a um incremento crescente da CIM e ao surgimento de resistência (VIDAILLAC, 2013).

O ajuste de dose tem sido muito discutido, pois, mesmo fazendo ajuste pelo peso do paciente, levando em consideração a membrana dialítica utilizada ou até mesmo empregando doses suplementares de reforço, os pacientes estão sujeitos a apresentar níveis subterapêuticos de vancomicina (ISOPPO, 2013). Segundo Rybak et al. (2009), o nível sérico deve ser mantido em torno de 10 µg/mL para evitar desenvolvimento de linhagens de *S. aureus* resistentes a vancomicina. No caso de infecções mais graves como meningites, osteomielites, endocardite, bacteremia entre outras, deve se manter os níveis séricos entre 15 e 20 µg/mL.

Em um hospital no estado de SP, resultados de doseamento de vancomicina no soro de pacientes em hemodiálise mostraram que 86% dos pacientes não apresentavam concentrações acima de 10 µg/mL (MARENGO et al., 2010).

Em trabalho de nosso grupo de pesquisa foi mensurada a concentração sérica de vancomicina durante o tratamento de pacientes em hemodiálise na

Grande Vitória/ES, mostrando que em coletas feitas durante duas semanas de terapia, 77,8% das amostras apresentaram concentrações inferiores a 10 µg/mL. Quando os níveis foram mensurados em amostras coletadas imediatamente antes a próxima dose do antibiótico (concentração sérica mínima), 90,6% dos pacientes não apresentavam concentrações superiores a 10 µg/mL (VITÓRIA, 2015).

2.6. Consequências da subdosagem de antibióticos

Baixas concentrações de alguns antibióticos têm sido reportadas por estimular alterações nos microrganismos, as quais podem facilitar a adaptação bacteriana à diferentes tipos de estresses, como por exemplo, o estresse provocado pela pressão antimicrobiana (THI et al., 2011)

2.6.1. Seleção de linhagens resistentes

Em estudo realizado por Gullberg (2011) foi relatado que concentrações de antibiótico muito abaixo da CIM reduz a taxa de crescimento de linhagens sensíveis sem causar efeito sobre linhagens resistentes. Em uma população bacteriana sob efeito de baixas doses de antibiótico, as linhagens sensíveis terão o crescimento cerca de 15% mais lento, enquanto linhagens resistente não sofrerão nenhum efeito, sugerindo que as linhagens resistente são fortemente selecionadas.

Roch et al (2014) cultivou três linhagens isolados clínicos de MRSA, inicialmente classificadas como de VSSA, durante 18 dias na presença de 4 antibióticos diferentes, 3 beta-lactâmicos (Imipenem, Ceftazidima, e Ceftriaxona) e vancomicina em doses subinibitórias. Os resultados mostraram aumento progressivo na resistência à vancomicina tanto pelas linhagens tratadas com beta-lactâmicos quanto pelas tratadas com vancomicina. Nesse mesmo estudo, a amostra submetida a crescimento sob ação de vancomicina apresentou aumento moderado no MIC para o antibiótico Daptomicina.

2.6.2. Morfologia bacteriana

O efeito de doses subinibitórias de agentes antimicrobianos sobre a morfologia das células bacterianas foi estudado por Thi et al (2011). Foi observado que ampicilina, ciprofloxacina, trimetopim, sulfametoxazol e sulfametoxazol/trimetoprim, produziram alterações morfológicas nas células de *Escherichia coli* ME12, aparecendo filamentos longos após 4 horas de tratamento. Quando tratadas com doses subinibitórias de imipenem produziram células em forma de esferas.

Silvestro e colaboradores (2006) avaliaram efeito de concentrações subinibitórias de clindamicina sobre a morfologia de *Bacteroides fragilis*, resultando que a bactéria crescida sob essas condições, analisada por microscopia de luz, apresentou células alongadas e filamentosas. Também foi observada em culturas crescidas com ação subinibitória do antibiótico, uma diminuição no número de células que apresentaram cápsula, estrutura observada em bactérias crescidas sem a ação do antibiótico.

2.6.3. Interação patógeno-hospedeiros (fatores virulência)

Estudos recentes mostram que concentrações subinibitórias de antibióticos podem modular a expressão de fatores de virulência em *S. aureus* e com isso impactar nas infecções graves por esse microrganismo (OTTO et al., 2013)

Sabe-se que a adesão bacteriana pode ser alterada pela presença de antimicrobianos ou de determinantes de resistência. Já foi demonstrado que *S. aureus* resistente a fluoroquinolonas aumenta a expressão de proteínas ligadoras de fibronectinas, quando exposto a concentrações subinibitórias de ciprofloxacino. Fibronectinas são proteínas extracelulares que, associadas a outros componentes, promovem a adesão entre *S. aureus* aos tecidos do hospedeiro (BISOGNANO et al., 1997, MCCOURT et al., 2014). Um dos principais determinantes de virulência de *S. aureus* é a produção de uma exoproteína chamada alfa-toxina. Esta toxina apresenta atividade citolítica, hemolítica e dermonecrótica, exercendo seu efeito pela geração de poros transmembrana, que disparam os eventos da apoptose (BHAKDI & TRANUM-JENSEN, 1991, FARIAS, FROTA, 2015). O cultivo de *S. aureus* na presença

do beta-lactâmico nafcillin induz a expressão da alfa-toxina e aumenta a letalidade do microrganismo em camundongos (KERNODLE *et al.*, 1995), sugerindo que o tratamento com beta-lactâmicos pode aumentar a virulência de algumas linhagens de estafilococos (KAPLAN *et al.*, 2012). Ohlsen e colaboradores estudaram o efeito de concentrações subinibitórias de vários antimicrobianos na expressão do gene codificador da alfa-toxina (*hla*). O mais notável achado foi a forte indução do gene *hla*, sendo os mais potentes indutores os antimicrobianos beta-lactâmicos, dentre os quais se destacou o imipenem. Eritromicina, clindamicina, vancomicina e gentamicina não induziram a expressão da toxina (OHLSEN *et al.*, 1998). A toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), produzida por algumas linhagens de *S. aureus*, também sofre interferência de antimicrobianos. Andrews e colaboradores descreveram a síndrome do choque tóxico não menstrual em pacientes que fizeram uso prévio de beta-lactâmicos (ANDREWS *et al.*, 2001).

Biofilme é outro importante atributo de virulência, principalmente no caso de bacteremias, que podem ter como origem cateteres que são comuns vias de acesso no paciente hemodialítico. Quando completamente formado, o biofilme é constituído por várias camadas de células embebidas em um material extracelular que consiste da complexa mistura de vários açúcares constituintes da parede celular, proteínas extracelulares e ácido teicóico (EIFF *et al.*, 2000, ARCIOLA *et al.*, 2012). Essas formações são causas de infecções persistentes, sendo que várias infecções hospitalares como as relacionadas ao uso de cateter venoso estão claramente associadas com a formação de biofilme na parede desses materiais (STEWART, COSTERTONW, 2001; ARCIOLA *et al.*, 2012). Um levantamento de dados de unidades de diálise no Brasil estimou que o percentual de pacientes em uso de cateter venoso como acesso para a hemodiálise foi de 15,4% (SESSO *et al.*, 2014). Entretanto, um estudo realizado em unidade de hemodiálise em hospital universitário no Rio Grande do norte mostra outra realidade, pois de 380 pacientes que passaram pelo tratamento hemodialítico entre os anos 2011 e 2012, 61,3% destes utilizaram cateter como forma de acesso vascular (LEITE *et al.*, 2013). Dado similar também foi encontrado em estudo realizado em centros de hemodiálise da grande Belo Horizonte (MG). No período de janeiro de 1997 a dezembro de

2007, 51% dos pacientes iniciaram a hemodiálise por CVC, destes, 35% destes apresentaram infecções, sendo este o principal motivo de retirada dos cateteres (SOUZA et al., 2011).

Diminuição na produção de biofilme por estafilococos sob pressão de antimicrobianos em doses subinibitórias já foi documentada para linhagens de estafilococos coagulase negativa frente a beta-lactâmicos (CERCA et al., 2005); *S. aureus* frente a triclosan e *S. epidermidis* frente a cefazolina (LATIMER et al., 2012; RUPP et al., 1998).

Dentre os poucos relatos existentes, citam-se os recentes achados de Abdelhady (2014) que indicam que doses subinibitórias de vancomicina podem aumentar a formação de biofilme em linhagens de MRSA. Igualmente, Mirani e Jamil (2011) indicaram que dose subletal de vacomicina induz a formação de biofilme por uma linhagem de *S. aureus* com resistência intermediária a vancomicina, da mesma forma que Kaplan (2012) relata que baixos níveis de beta-lactâmicos induzem a produção em diferentes linhagens de *S. aureus* (KAPLAN et al., 2012). Por outro lado, em estudo anterior, Rupp e Hamer (1998) relataram significativa diminuição na formação de biofilmes em cateteres intravasculares por *S. epidermidis* exposto a $\frac{1}{2}$ CIM de vancomicina, corroborando dados anteriores de Carsenti-Etesse e colaboradores (1993), que demonstraram diminuição na aderência de *S. aureus* e *S. epidermidis*, também induzida por $\frac{1}{2}$ CIM de vancomicina. Dados controversos podem refletir diferenças metodológicas, destacando-se ainda o fato de que a maioria destes estudos foram conduzidos em concentrações abaixo da CIM, diferente do contexto clínico exposto. O destaque em azul nesta página vai entrar na página 28, após o 2 paragrafo.

Níveis de ciprofloxacina abaixo do inibitório regularam positivamente a expressão de proteínas ligadoras de fibronectina em *S. aureus*, o que aumenta a aderência bacteriana às células do hospedeiro. Tal resposta é induzida devido ao estresse provocado pelo baixo nível do antibiótico (ANDERSSON; HUGHES, 2014)

Goneau et al. (2015) desafiou patógenos urinários (*Staphylococcus saprophyticus* e *Escherichia coli*) com níveis subinibitórios de ciprofloxacina,

ampicilina e gentamicina, que foram capazes de induzir a expressão de adesinas críticas para a colonização, resultando no aumento da formação de biofilmes.

O efeito de aumento na sensibilidade bacteriana aos fagócitos foi documentado para microrganismos diversos expostos a doses subinibitórias de vários antimicrobianos, a saber: gemifloxacim contra *S. aureus* e *Escherichia coli* frente a neutrófilos (DAL SASSO et al., 2003); imipenem contra *Pseudomonas aeruginosa* (SASAHARA et al., 2003). Segundo Sengupta e colaboradores (2013), concentrações subinibitórias de antimicrobianos podem provocar alterações na membrana da bactéria que podem alterar a relação patógeno-hospedeiro, interferindo na fagocitose. O padrão encontrado na literatura é, mais uma vez, controverso, indicando ora facilitação do processo de fagocitose, ora inibição do processo. Além disso, os dados relatados são obtidos em condições subinibitórias dos fármacos, o que difere da situação clínica apresentada. Assim, a hipótese de interferência positiva ou negativa de vancomicina em dose subterapêutica na fagocitose de *S. aureus* permanece não respondida.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Investigar se a subdosagem de vancomicina, encontrada no paciente em hemodiálise, altera a fisiologia, susceptibilidade e virulência de *S. aureus*.

3.2. Objetivos Específicos:

1. Avaliar se a exposição de *S. aureus* a dose subterapêutica de vancomicina interfere em seu crescimento e morte.
2. Investigar se a exposição de *S. aureus* a dose subterapêutica de vancomicina aumenta a concentração inibitória mínima deste e de outros fármacos.
3. Pesquisar se a exposição de *S. aureus* a dose subterapêutica de vancomicina influencia sua capacidade de formação de biofilme.
4. Investigar se a exposição de *S. aureus* a dose subterapêutica de vancomicina altera sua susceptibilidade à ação bactericida de leucócitos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras bacterianas:

Foram utilizadas neste estudo duas amostras de *S.aureus* da *American Type Culture Collection* ATCC 29213 (CIM de vancomicina = 0,5 µg/mL) e ATCC 33591(MRSA) (CIM de vancomicina = 1,0 µg/mL), além de 19 amostras clínicas isoladas de bacteremias de pacientes em tratamento hemodialítico que fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Biologia de Microrganismos e Antibióticos (BioMA-Lab) do CCS-UFES . Todas as amostras foram estocadas em meio de preservação em freezers a -20°C.

4.2. Exposição das amostras a doses subterapêuticas de vancomicina:

Foram preparadas placas de “Petri” descartáveis (CRALPLAST®) contendo um gradiente de concentração de vancomicina (Cloridrato de Vancomicina – SIGMA-ALDRICH®). O método emprega uma placa com duas camadas de agar. O ágar MH (MUELLER HINTON– OXOID®) fundido (10 mL) é acrescido de solução de vancomicina (concentração final de 10 µg/mL) e vertido em uma placa de Petri que é mantida em posição ligeiramente inclinada (5 graus). Após a solidificação, vira-se sobre a mesma, agora sem inclinação, em superfície nivelada, igual volume do ágar MH. Após a difusão do fármaco, é obtido um gradiente de concentração em cada placa, variando de zero a 10 µg/mL (Figura 1) (SZYBALSKI, 1952).

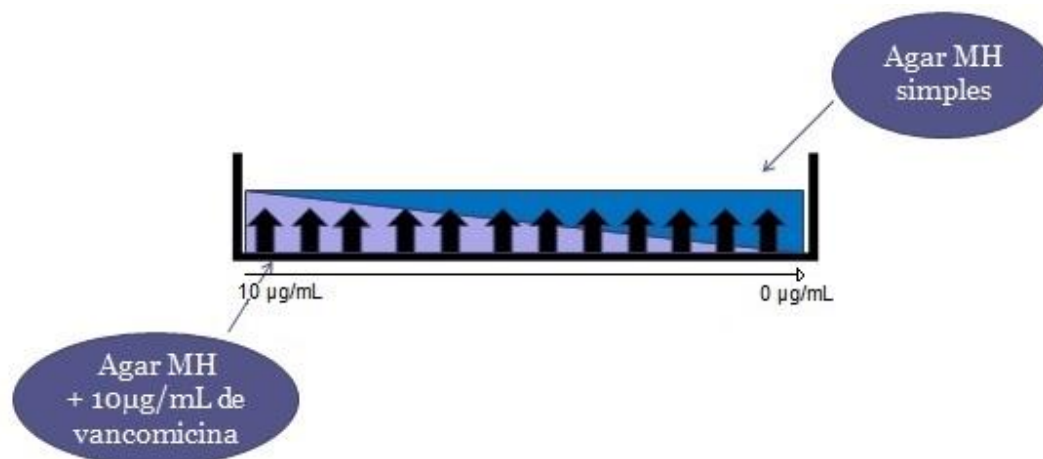


Figura 1: Esquema de montagem da placa gradiente. A camada inferior contém agar Mueller Hinton (MH) acrescido de vancomicina (10 µg/mL), enquanto a camada superior contém agar MH simples. Com a difusão do antibiótico do meio inferior para o superior, forma-se o gradiente de concentração.

Na sequência, a cultura bacteriana com 24 h de crescimento em caldo BHI (BRAIN HEART INFUSION BROTH - MERCK®) foi ajustada em salina, conforme a escala 3 de *Mac Farland* uma alíquota de 100 µl foi espalhada, uniformemente sobre a superfície do meio, com o auxílio da alça de “Drigalsky”.

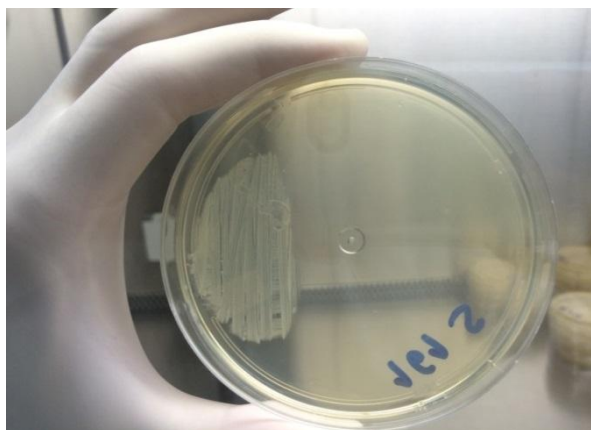


Figura 2: Placa com gradiente de concentração de vancomicina (0-10 µg/mL) exibindo crescimento da linhagem de *S. aureus* na extremidade de menor concentração do antimicrobiano.

Após incubação a 37°C por 24 horas, novas suspensões bacterianas foram preparadas a partir de raspados do crescimento bacteriano (figura 2) e semeadas em novas placas gradiente. Estes inóculos foram realizados uma vez ao dia, durante 05 dias consecutivos, representando o intervalo entre doses de vancomicina nos pacientes com insuficiência renal crônica, em tratamento hemodialítico. Após o último dia de experimento as amostras foram raspadas das placas e lavadas 03 vezes com *Phosphate buffered saline* (PBS) por meio de centrifugação (SIGMA *Laborzentrifugen*) por 10 minutos a 4000 rpm a 4°C. Como controle, as mesmas amostras foram repicadas diariamente no mesmo meio, porém sem antimicrobiano. Estes foram os inóculos bacterianos utilizados em todos os testes, a exceção da curva de morte.

4.3. Curva de Crescimento:

Foi avaliado se a exposição dos microrganismos a dose subterapêutica de vancomicina influencia no padrão de crescimento de *S. aureus*. Esse experimento foi realizado para definição do tempo necessário para início da fase exponencial (log) das cepas ATCCs 29213 e 33591 antes e após exposição a vancomicina.

Primeiramente, foi feita a determinação da relação entre a Densidade ótica (DO) / Unidade Formadora de Colônias (UFC). A linhagem de *S. aureus* ATCC 29213 foi ajustada em uma suspensão a 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e diluída de 10^{-1} a 10^{-7} . Essas diluições foram lidas em espectrofotômetro (Coleman 35-D) a 625 nm. Os tubos das diluições 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} foram novamente diluídos de 10^{-1} a 10^{-7} e estas foram então plaqueadas em ágar MH e incubadas a 37°C (18 a 24 horas) para contagem de UFC. Com os resultados da contagem de UFC e das DOs obtidas foi feita a relação DO/UFC, ou seja, foi definida a concentração bacteriana relativa a cada DO.

Foram utilizados no experimento tanto amostras cultivadas por 5 dias nas placas gradiente quanto seus respectivos controles (cultivadas por 5 dias na ausência de vancomicina). O inóculo foi ajustado em caldo BHI na DO 0,269 a 625 nm (que equivale a $2,6 \times 10^8$ UFC/mL). Esse inoculo foi diluído até 10^{-4}

($2,6 \times 10^4$ UFC/mL) em 300 mL de caldo BHI, que foi então incubado sob agitação (130 rpm) a 37°C (Shaker-incubator- AGIMAXX). A cada 30 minutos (durante 6 horas) alíquotas de 3mL eram retiradas para leitura em espectrofotômetro (625nm) e 500µL retirado para diluição seriada e plaqueamento em ágar MH para contagem de UFC.

4.4. Curva de Morte:

O pré-inóculo foi preparado em 10 ml de caldo BHI, que foi incubado por 15 horas a 37°C. O inóculo inicial foi ajustado a partir do pré-inóculo em 300 ml de caldo BHI no espectrofotômetro (DO=0,05 a 540 nm). A cultura ajustada foi dividida em 03 partes de 100 ml, que foram incubadas a 37° sob agitação (100rpm), por 6 horas. O primeiro frasco representou o controle de crescimento, o segundo foi acrescido de vancomicina (concentração final de 10µg/mL) no momento do ajuste do inóculo (T0), e o terceiro foi acrescido de vancomicina (concentração final de 10 µg/mL) após 3 horas de incubação (T3 – Tempo definido previamente no experimento de curva de crescimento como início da fase log). A cada 30 minutos foi retirada uma alíquota de 3 ml de cada cultura para leitura da DO e 0,1 mL para diluição seriada (10^{-1} até 10^{-7}) em salina (0,9%). Cada diluição foi semeada em placas de ágar BHI e incubadas por 24 horas a 37°. Após a incubação foi feita a contagem de colônias. Com os resultados das DOs e da contagem de células foram construídas as curvas de crescimento dos microrganismos na presença de dose subterapêutica de vancomicina. Este teste foi realizado com as amostras de referência ATCC 29213 e ATCC 33591.

4.5. Determinação da susceptibilidade à vancomicina, oxacilina e daptomicina após subcultivos nas placas gradiente:

Foram testadas as duas amostras de referência (ATCCs 29213 e 33591) mais as 19 linhagens clínicas de *S. aureus*. Todos os microrganismos foram cultivados durante 05 dias consecutivos em placas com gradiente de concentração de vancomicina (0-10µg/mL), conforme descrito no item 3.2.

Como controle, as mesmas linhagens foram cultivadas pelo mesmo período em placas sem adição de antimicrobiano.

Soluções estoque dos antimicrobianos cloridrato de vancomicina, oxacilina sódica monoidratada e daptomicina (todos Sigma-Aldrich) foram preparadas conforme potências informadas nos certificados de análise, bem como solventes edulcentes recomendados pelo fabricante. As soluções na concentração de 1000 µg/mL (vancomicina e oxacilina) e 100 µg/mL (daptomicina) foram aliquotadas e armazenadas em freezer -20°C, por até 30 dias.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos fármacos foi realizada pelo método de microdiluição em caldo utilizando-se microplacas de poliestireno de 96 poços (Corning incorporated-COSTAR®), de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Utilizou-se o meio *Mueller Hinton II Broth- cátion adjusted* (BD-BBL), aqui denominado CAMHB, que foi suplementado com mais 50 µg/mL de cálcio para - e com NaCl (2%) para oxacilina.

As microplacas foram montadas da seguinte maneira: foram distribuídos na primeira fileira (linha A) 100 µL do antimicrobiano diluído em CAMHB (maior concentração a ser testada). Nos demais poços da placa (linhas B-G) foram adicionados 50 µL de CAMHB. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas duplas do antimicrobiano, retirando-se 50 µL da solução de antimicrobiano da linha A e inoculando na linha B, e assim sucessivamente até a linha F. As concentrações variaram de 4 a 0,125 µg/mL. A linha G foi utilizada como controle de crescimento, recebendo apenas o inóculo bacteriano. A linha H foi o controle de esterilidade do meio CAMHB, não sendo inoculada com o microrganismo. Cada amostra bacteriana foi testada em duplicada, ocupando duas colunas da placa.

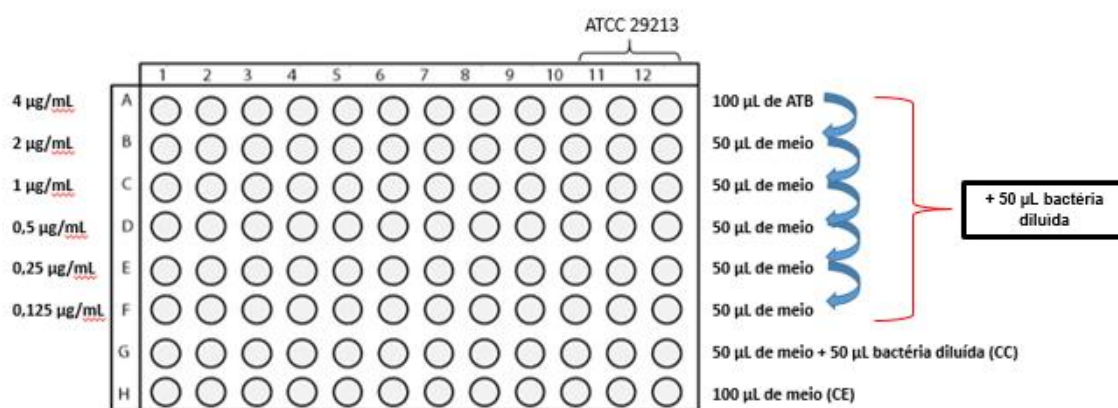


Figura 3 : Microplaca de poliestireno de 96 poços. Linhas A-F foram feitas diluições do antimicrobiano de 4 a 0,125 µg/mL, na linha G o controle de crescimento (CC) e linha H o controle de esterilidade (CE) do teste.

Cada amostra bacteriana foi diluída em solução salina (0,9%) até se obter DO = 0,269 (625 nm) que equivale a concentração de $2,6 \times 10^8$ UFC/mL. Posteriormente, foi realizada diluição 1:100 em caldo (50µL da suspensão em 4950µL do meio), obtendo-se uma concentração de $2,6 \times 10^6$ UFC/mL. Em seguida 50 µL desta suspensão foram adicionados aos poços contendo o antimicrobiano nas concentrações variadas. Logo, cada poço recebeu como volume final 100 µL (50 µL de meio e 50 µL de microrganismo). Posteriormente, as placas foram seladas com filme plástico e incubadas por 24 horas a 37 °C. A CIM foi considerada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano. A interpretação dos testes foi realizada de acordo com o CLSI, 2015.

4.6. Ensaio de Biofilme:

As suspensões bacterianas foram ajustadas em espectrofotômetro com leitura de DO igual a 0,269 (625nm) que corresponde à $2,6 \times 10^8$ UFC/ml. Alíquotas de 10µL foram pipetadas em poços de uma microplaca de poliestireno de 96 poços de fundo chato contendo 190µL de caldo TSB-G (*Trypticase Soy Broth* suplementado com 0,25% de glicose). Foi utilizada uma linhagem padrão de *S. aureus* produtora de biofilme (ATCC 33591) como controle positivo e uma não produtora como controle negativo (*S. epidermidis*

ATCC 12228). Como branco foram deixados poços com TSB-G, sem inóculo bacteriano. A microplaca foi tampada e selada com filme plástico e incubada, sob agitação orbital (110 rpm), a 37°C, por 24 horas. Após esse período, o caldo presente nos poços foi descartado e a placa lavada 2 vezes com PBS (pH 7,2) e deixada para secar a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida foram adicionados 200µL de safranina a 0,1% em cada poço. Após 15 minutos, a placa foi lavada com água destilada e deixada para secar por mais 60 minutos. Em seguida foi adicionado a cada poço 100µL de etanol/éter 97% (v/v) para solubilizar o corante e em seguida foi acrescentado 100µL de PBS. A microplaca foi lida em leitor de microplaca a 490nm (STEPANOVIC, 2007).

Foram realizadas 03 réplicas técnicas em cada experimento e 04 réplicas biológicas em semanas diferentes. Para cada experimento independente (replicata biológica), os inóculos bacterianos eram obtidos pelo cultivo das amostras por 05 dias consecutivos em meio contendo vancomicina, juntamente com seus controles, conforme item 3.2. Os dados dos 04 experimentos independentes foram representados em *bloxplot* e analisados quanto à significância estatística das diferenças observadas pelo teste não paramétrico para amostras pareadas *Wilcoxon Signed Ranks Test*, com $p \leq 0,05$. A classificação da amostra como produtora ou não produtora de biofilme foi realizada de acordo com o proposto por Stepanović et al, 2007: amostras com uma DO superior à média (\bar{x}) mais três vezes o desvio padrão (DP) dos controles negativos (cn) ($\bar{x}DO_{cn} + 3DP_{cn}$) foram consideradas produtoras de biofilme.

4.7. Ensaio de atividade bactericida do sangue total:

4.7.1. Preparo do inóculo

Para realização do ensaio de resistência a ação bactericida dos leucócitos foi necessário ajustar a concentração das amostras sensibilizadas em placa gradiente e seus respectivos controles, para a DO de 0,269 (625nm) que equivale a $2,6 \times 10^8$ UFC/mL. Após ajuste, as amostras foram diluídas (1:100) até $2,6 \times 10^6$ UFC/mL, que foi o inóculo inicial. As amostras testadas foram as ATCCs 29213 e 33591 e as amostras clínicas 101 e 198, que foram

selecionadas por terem apresentado maiores alterações no ensaio de biofilme entre as linhagens estudadas. Após cultivo durante 5 dias em placas gradiente a amostra 101 apresentou maior aumento na produção de biofilme e a 198 apresentou maior redução.

4.7.2. Coleta de sangue total

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Ufes (parecer no. 903.454) em 09/12/2014. Foi coletada amostra de sangue de 02 voluntários adultos saudáveis (24 e 27 anos de idades) por meio de punção de veia periférica, por técnico de laboratório treinado para executar tal procedimento.

4.7.3. Ensaio da atividade bactericida de sangue total

Após a contagem do número de leucócitos em aparelho de hematologia (Sysmex XT 4000i) na unidade de laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (UFES/EBSERH), o sangue e a suspensão bacteriana foram misturados em tubo falcon na proporção de 2 leucócitos para cada bactéria. Tubos controle foram preparados substituindo o sangue por HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*- Sigma Aldrich). Todos os tubos foram colocados em homogeneizador hematológico (SP-Labor, SP-260) em rotação de 08 rpm em estufa a 37°C. Nos tempos zero, 30 e 60 minutos após início da incubação, alíquotas de 200µL de cada amostra foram retiradas e adicionadas à 9,5 mL de água, seguindo-se agitação em vórtex (1 min) e repouso (10 min) para lise dos leucócitos. Após a lise, foram adicionados 300µL de salina 5M para restaurar a isotonicidade do meio. Para a contagem de células bacterianas viáveis, foram realizadas diluição seriadas da suspensão isotônica e plaqueamento em ágar MH. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas (DEFORGE et al., 2000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

5.1. Curva de Crescimento

Analisando os dados da figura 4, observamos que não houve diferença entre o crescimento das linhagens após o cultivo das mesmas em vancomicina. Com este ensaio definimos o tempo que marca o início da fase log, bem como a concentração celular neste ponto para as linhagens cultivadas ou não na presença do fármaco. O início da fase log foi em 150 min para ATCC 29213 e em 180 min para ATCC 33591.

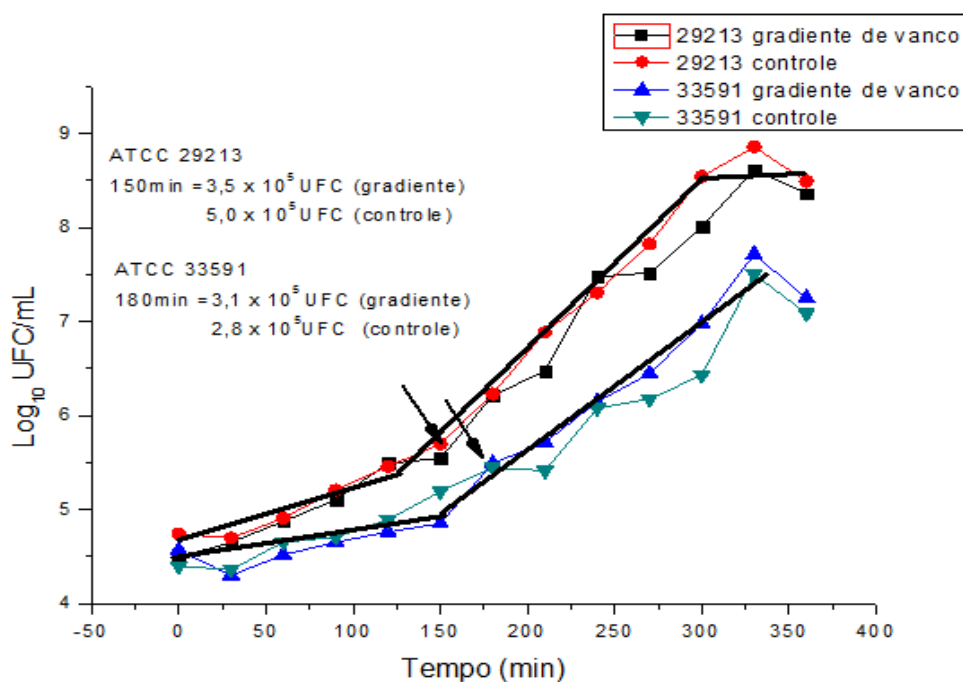
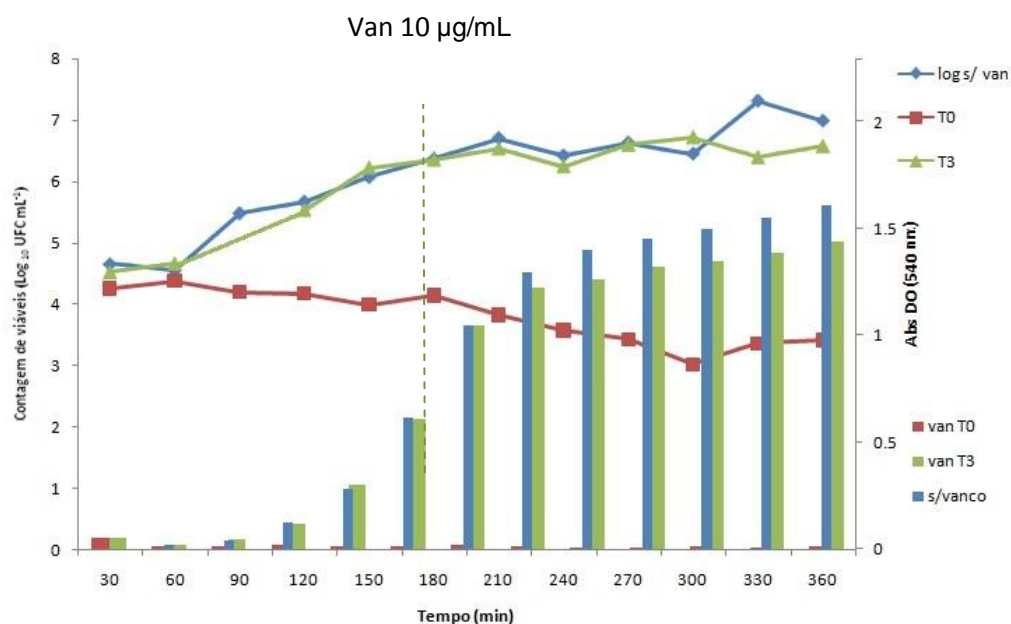


Figura 4 : Curvas de crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 33591 realizadas após cultivo das linhagens na presença de dose subterapêutica de vancomicina (placas gradiente) durante 5 dias consecutivos. Como controle, as mesmas cepas foram cultivadas durante o mesmo período, mas sem adição do antimicrobiano. As linhas pretas resumem o perfil de crescimento e as setas indicam os primeiros pontos da fase log de cada linhagem (150 min para ATCC 29213 e 180 min para ATCC 33591)

5.2. Subdosagem de vancomicina apresenta limitado efeito contra as linhagens de *S. aureus* em fase exponencial de crescimento

Como ilustrado na figura 5, vancomicina apresentou maior atividade quando foi adicionada à cultura no início da incubação (linha vermelha), apresentando atividade bacteriostática e bactericida contra a amostra 29213 e 33591, respectivamente. Entretanto, quando adicionada na fase exponencial do crescimento bacteriano (180 min) (linha verde), não apresentou atividade contra a amostra 29213 e apenas atividade bacteriostática contra 33591. Este achado indica maior sensibilidade da amostra 33591, e um possível efeito de vancomicina dependente (inversamente proporcional) da atividade metabólica bacteriana.

(A)



(B)

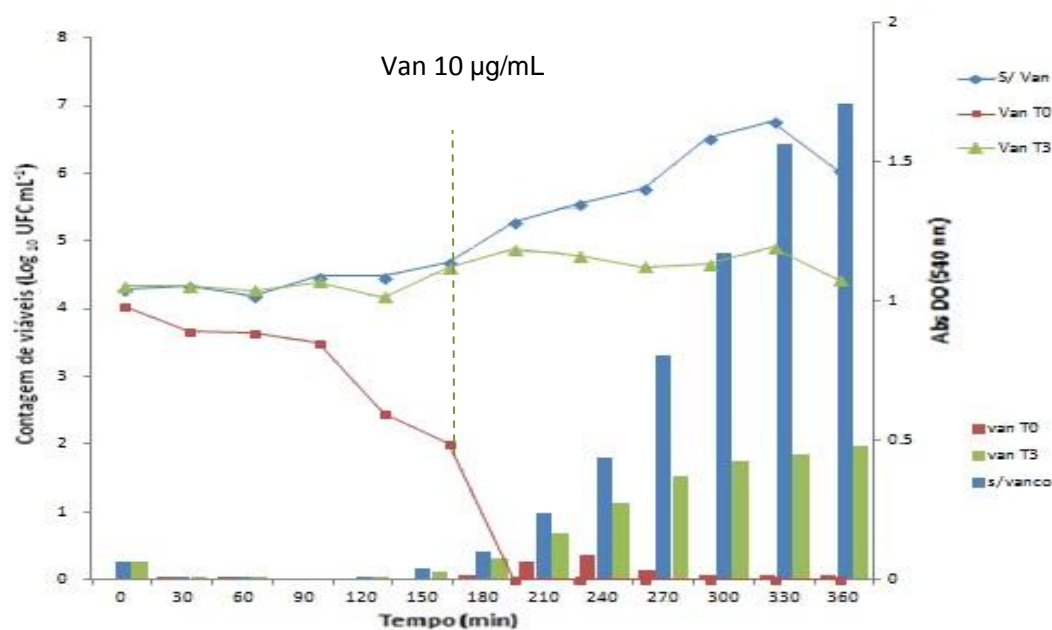


Figura 5: Curvas de morte de *S. aureus* (A) - ATCC 29213 (CIM = 0,5 mg/L) e (B) - ATCC 33591 (CIM= 1,0 mg/L). As amostras foram cultivadas em caldo BHI durante seis horas, sob agitação (110 rpm), sendo acrescentado à cultura 10 µg/mL de cloridrato de vancomicina no tempo T0 (inóculo inicial) (linha e barra vermelha) e T3 (3h após inóculo) (linha e barra verde), correspondendo ao início da fase *log* de crescimento. Linhas e barras azuis representam a cultura controle, sem vancomicina. As barras demonstram as DOs e as linhas representa as UFCs.

O limitado efeito de subdosagem de vancomicina contra as linhagens de *S. aureus* em fase exponencial de crescimento contradiz o conhecimento geral de que fármacos que atuam em nível de parede celular são mais efetivos quando o microrganismo está em fase exponencial de crescimento. Outra explicação para este achado seria o efeito do inóculo, uma vez que a amostra 29123 que se mostrou mais resistente alcançou maior concentração bacteriana ($2,3 \times 10^6$ ufc/mL) do que a amostra 33591 (4×10^4 ufc/mL) no tempo de 180 min, embora ambas partissem do mesmo inóculo inicial. A curva foi acompanhada até 360min, de forma que a atividade inibitória pode ter aparecido depois deste ponto, o que indicaria uma atividade dependente do tempo. Entretanto esta última hipótese não foi testada. De fato, alguns autores relatam atividade de vancomicina tempo-dependente, enquanto outros indicam concentração-dependente (RYBAK M.J., 2006; PEA F. et al., 2009). De qualquer forma, a amostra 29213 atingiu a fase estacionária, permanecendo sem efeito de vancomicina durante o período acompanhado. É válido salientar que as CIMs das amostras testadas são de 0,5 e 1,0 µg/mL para 29213 e 33591, respectivamente, ou seja, a concentração de vancomicina utilizada corresponde a 20 vezes a CIM da cepa 29213 e 10 vezes a CIM de 33591. De fato, estes dados mostram que os microrganismos em doses subterapêuticas de vancomicina permanecem viáveis e susceptíveis a alterações fisiológicas que podem interferir na relação patógeno-hospedeiro.

5.3. Subdosagem de vancomicina diminui a sensibilidade de *S. aureus* à vancomicina e daptomicina, mas não à oxacilina

Após 5 dias de cultivo das 21 amostras em placas com gradiente de concentração de vancomicina, observou-se alterações na CIM de todos os antimicrobianos testados (tabela 1). A CIM de vancomicina subiu de 1µg/mL para 2 µg/mL para a maioria das amostras (>90%) indicando que a exposição prévia à subdosagens do glicopeptídeo pode diminuir a sensibilidade de *S. aureus* (figura 6). Sabe-se que é aceitável a variação de até uma diluição no teste de microdiluição entre replicatas de uma mesma amostra bacteriana. Entretanto, a variação ocorreu em mais de 90% dos isolados, mantendo-se o

padrão nas replicatas biológicas (repetição do teste em dias diferentes). Além disso, o incremento na CIM de vancomicina para valores acima de 1,5µg/mL é especialmente preocupante, pois tem sido associado a alto índice de mortalidade, mal prognóstico, falha terapêutica e aumento da virulência de *S. aureus* (MOISE-BRODER et al, 2004; SAKOULAS et al., 2006; PELEG et al., 2009; AGUADO et al., 2011; VAL RAL et al., 2012).

Alguns estudos clínicos mostram progressivo aumento na CIM de vancomicina para *S. aureus*, indicando o potencial de seleção de clones resistentes durante o tratamento antimicrobiano (RHEE, 2005; STEINKRAUS, 2007; MASON, 2009).

Tabela 1: CIM de vancomicina, daptomicina e oxacilina após cultivo das amostras durante 5 dias em placas com gradiente de concentração de vancomicina. Como controle, as amostras foram testadas após cultivo pelo mesmo período em meio sem antimicrobiano.

Amostras	CIM (µg/mL)					
	VANCOMICINA		DAPTOMICINA		OXACILINA	
	Controle	Gradiente	Controle	Gradiente	Controle	Gradiente
33591	1	2	0,5	1	> 4	> 4
29213	0,5	1	0,5	0,5	0,25	0,5
223	1	2	0,5	1	< 0,12	0,25
211	1	2	0,5	1	0,25	0,25
81	1	2	1	2	<0,12	1
101	1	2	0,5	1	0,5	2
88A	1	2	1	2	0,5	0,5
172	1	2	0,5	2	0,5	0,25
170	1	2	0,5	2	0,5	0,25
131	1	2	0,5	1	0,25	0,25
198	1	2	0,5	2	<0,12	2
184	1	2	0,5	1	0,5	0,25
217	1	2	0,5	1	0,5	0,5
137	1	2	0,5	1	0,5	0,12
150	1	2	0,5	1	0,5	1
77	0,5	1	0,5	1	0,5	0,25
161	1	2	1	2	0,25	1
113	1	2	1	1	0,5	0,5
65	1	2	1	1	<0,12	<0,12
122	1	2	1	2	512	512
127	1	2	1	2	512	512
CIM₅₀	1	2	0,5	1	0,5	0,5
CIM₉₀	1	2	1	2	>4	>4

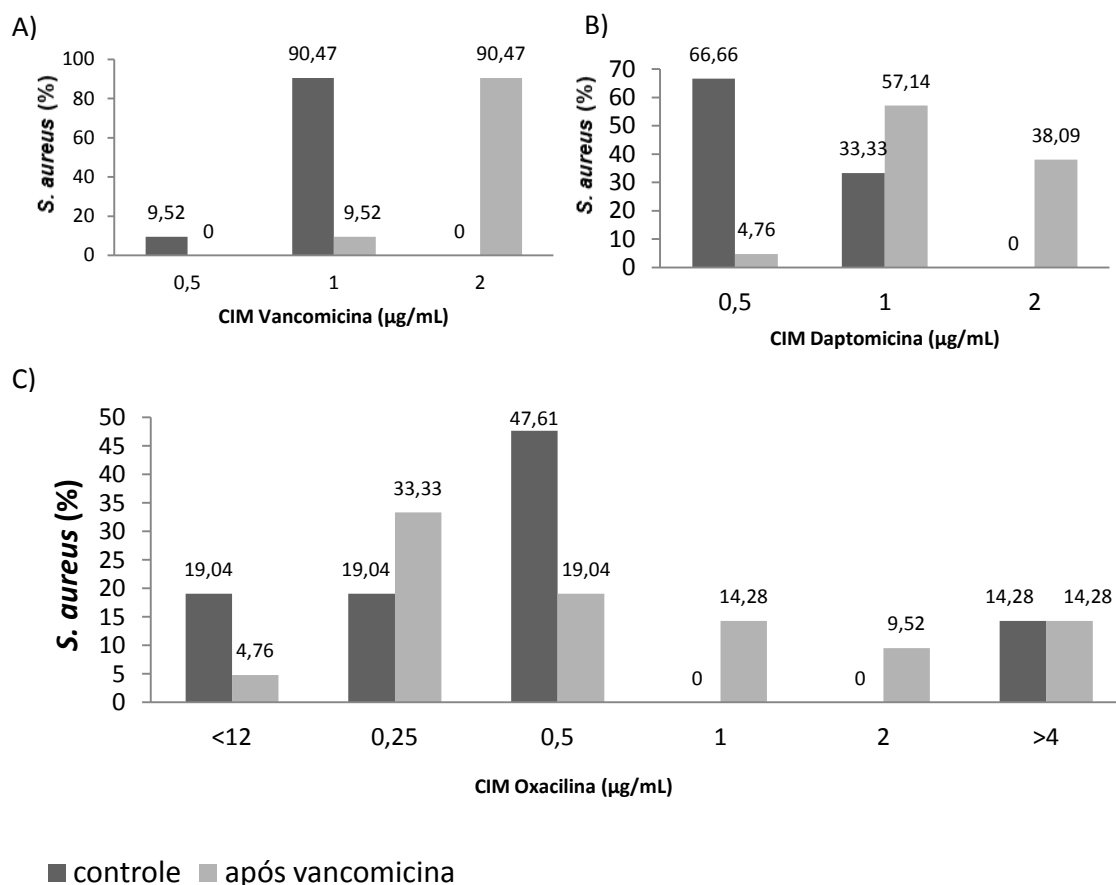


Figura 6: Variação da CIM de vancomicina (A), daptomicina (B) e oxacilina (C) após o cultivo de *S. aureus* (n=21) por 5 dias consecutivos em placas contendo gradiente de concentração de vancomicina (barra cinza claro). Como controle, as amostras foram testadas após cultivo pelo mesmo período em meio sem antimicrobiano (barra cinza escuro).

PELEG et al. (2009) em estudo utilizando larvas de *Galleria mellonella* infectadas com diferentes linhagens de *S. aureus*, relatou que linhagens com maiores CIMs de vancomicina (VISA e hVISA) geram menores taxas de mortalidade das larvas, mostrando associação inversa entre susceptibilidade e virulência bacteriana. A atenuação da virulência bacteriana estaria relacionada à disfunção do gene *agr* (*accessory gene regulator*), que é um regulador global

de virulência e que já foi associado com surgimento dos fenótipos VISA e hVISA.

A redução na sensibilidade pode estar relacionada a alterações na parede celular de *S. aureus*. Linhagens VISA e hVISA possuem parede celular mais espessa, superfície irregular e septos anormais quando comparadas às linhagens sensíveis. As irregularidades nos septos formados na divisão celular reduzem, significativamente, o efeito do antimicrobiano, pois vancomicina possui maior atividade na fase replicativa dos microrganismos e tais alterações dificultam a chegada das moléculas de vancomicina ao seu sítio de ação (BOBIN-DUBREUX et al, 2000, SIERADZKI, TOMASZ, 2003, CUI et al, 2006, PELEG et al., 2009).

Diretrizes recentes recomendam que a decisão de mudar de vancomicina para antimicrobianos alternativos deve ser guiada pela resposta do paciente e não pela CIM de vancomicina (MURRAY et al., 2013). Em casos de falha terapêutica no tratamento de bacteremias por *S. aureus*, a daptomicina tem sido a indicada. Assim, considerando o aumento da CIM de vancomicina, que prediz falha terapêutica, avaliou-se também a susceptibilidade das amostras de *S. aureus* à daptomicina. Igualmente, houve redução na sensibilidade à daptomicina após exposição das amostras a subdosagens de vancomicina. A maioria das amostras (66,6%) apresentavam CIM =0,5 µg/mL antes da exposição à vancomicina e observou-se uma transição de mais de 95% das amostras para CIMs ≥1 µg/mL, com 38% das amostras não sensíveis à daptomicina (CIM =2 µg/mL) (figura 6B). Daptomicina parece também afetar a síntese da parede bacteriana (STRYJEWSKI, 2007), de forma que o aumento concomitante da CIM de vancomicina e daptomicina após tratamento com vancomicina pode indicar pelo menos um alvo comum na síntese do peptidoglicano (HOWDEN et al., 2010, JONES et al., 2008, TENOVER et al., 2010). Embora a correlação de *Pearson* não tenha mostrado correlação significativa ($p=0,19$) entre as CIMs aqui apresentadas, Clemens, 2011, relatou associação entre a CIM de vancomicina e daptomicina, mencionando a discutível utilidade de daptomicina como substituto à vancomicina. De fato, a literatura contém casos de falhas em tratamentos de bacteremias por *S. aureus* iniciados com vancomicina, e falhas após mudança para daptomicina.

Entretanto, iniciar o tratamento com daptomicina pode ser vantajoso, pois pode evitar a diminuição da sensibilidade à vancomicina e à daptomicina e também evitar falhas terapêuticas. Em estudo de Murray e colaboradores, (2013) comparando tratamentos iniciados com daptomicina ou vancomicina, a taxa de falha terapêutica após 30 dias de tratamento foi significativamente menor nos pacientes tratados com daptomicina em comparação aos tratados com vancomicina, apresentando 20,0% e 48,2% de falha, respectivamente. A mortalidade e bacteremias persistentes também foram significativamente menores nos tratados com daptomicina apresentando 3,5% (daptomicina) vs 12,9% (vancomicina) e 18,8% vs 42,4%, respectivamente.

Ao contrário do aumento da CIM de vancomicina e daptomicina observado nos nossos experimentos, oxacilina apresentou redução da CIM na maioria das amostras após exposição à subdosagens de vancomicina (figura 6C). As várias alterações ocorridas na parede celular devido ao tratamento com vancomicina, além de aumentar a espessura também pode reduzir a expressão de proteína de ligação à penicilina 4 (PBP4). Essa perda de atividade da PBP4 tem sido relacionada à redução da CIM de meticilina em *S. aureus* (PILLAI et al., 2009, Sieradzki, Tomasz, 2003)

Essa relação inversa entre a CIM de vancomicina e de oxacilina foi observada por Naimi e colaboradores (2003). *S. aureus* isolado de paciente antes do tratamento com vancomicina apresentava resistência a oxacilina (CIM ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$) e sensibilidade a vancomicina (CIM ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$). Após alguns meses de tratamento com vancomicina o isolado apresentou maior resistência a vancomicina (CIM de 4 $\mu\text{g/mL}$) e sensibilidade a oxacilina (CIM ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$). Devido a essa relação inversa entre as CIMs de oxacilina e vancomicina, a utilização da combinação de vancomicina- oxacilina no tratamento de infecções por MRSA pode melhorar a eficácia do tratamento em alguns casos e pode evitar o desenvolvimento de resistência intermediária à vancomicina em linhagens de MSSA (NAIMI et al., 2003).

Nosso desenho experimental simulou, embora limitadamente, o intervalo de doses utilizado em muitos centros de hemodiálise para o tratamento de bacteremias, indicando significativa diminuição da sensibilidade dos

microrganismos dentro deste intervalo de tempo (5 dias). Assim, uma boa forma de reduzir o risco de falhas terapêuticas é realizar o monitoramento da dosagem sérica de vancomicina, de forma a evitar subdosagens no soro dos pacientes. Destaca-se, também, a importância de novas terapias, como a utilização de daptomicina no início do tratamento empírico, bem como a utilização da oxacilina concomitante com vancomicina ou no tratamento de infecções por MSSA. Estas condutas podem evitar o desenvolvimento de linhagens multirresistentes, reduzir falhas terapêuticas e a mortalidade.

5.4. Dose subterapêutica de vancomicina induz resposta diferenciada de produção de biofilme em *S. aureus*

A formação de biofilme é considerada como um dos principais fatores de virulência em muitas infecções por *S. aureus*, principalmente as crônicas. Este fator não só facilita a colonização bacteriana dos tecidos do hospedeiro, e cateteres, mas também promove a resistência à eliminação bacteriana mediada por agentes antimicrobianos e pela resposta imune do hospedeiro. (ABDELHADY et al., 2014, BOLES et al., 2010).

Dados obtidos de 4 experimentos independentes mostraram que o tratamento com vancomicina não alterou a produção de biofilme na população de *S. aureus* amostrada ($n=21$) ($p=0.184$) (figura 7). Entretanto, quando analisadas isoladamente, em 38% das amostras ($n=8$) a produção de biofilme foi aumentada ($n=5$) ou diminuída ($n=3$) após exposição ao fármaco ($p<0,05$) (figura 8). Por outro lado, nenhuma das amostras deixou de produzir biofilme após o tratamento com vancomicina. Esta resposta diferenciada das amostras clínicas ao tratamento com dose subterapêutica de vancomicina dificulta a previsão das consequências da subdosagem deste fármaco no paciente com infecção de corrente sanguínea por este microrganismo.

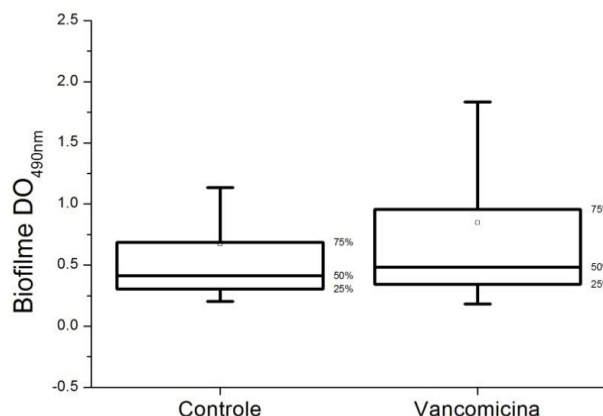


Figura 7: Produção de biofilme por amostras de *S. aureus* (n=21) após exposição a dose subterapêutica de vancomicina por 5 dias consecutivos. Dados de 4 experimentos independentes, representados em *boxplot* (mediana e quartis das medidas de densidade óptica [DO] a 490 nm). Controle sem exposição ao antimicrobiano. $p=0.18357$ no teste não paramétrico para amostras pareadas Wilcoxon Signed Ranks Test.

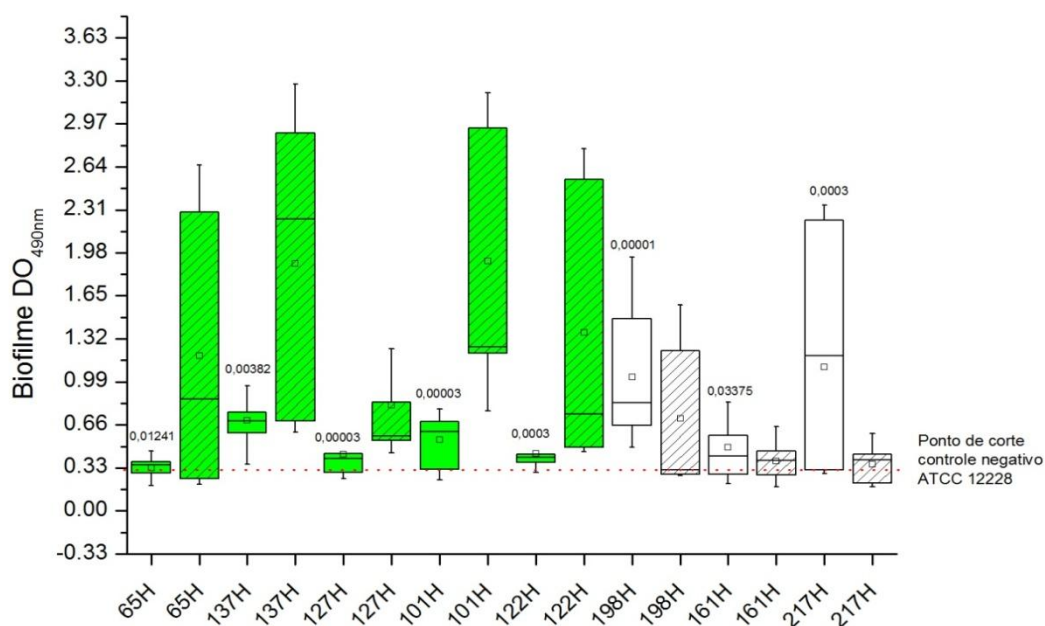


Figura 8: Produção de biofilme aumentada (verde) ou diminuída (branco) após exposição de amostras clínicas de *S. aureus* (n=9) a dose subterapêutica de vancomicina por 5 dias consecutivos (box achurados). Dados de 4 experimentos independentes, representados em *boxplot* (mediana e quartis das medidas de densidade óptica [DO] a 490 nm). Controle (Box sem achurado) sem exposição ao antimicrobiano. Significancia estatística $p<0,05$ (teste não paramétrico para amostras

pareadas Wilcoxon Signed Ranks Test.). Valores de p individuais anotados nos boxplots.

Em estudo realizado por Hsu e colaboradores em 2011, foi relatado que a presença de apenas 1 µg/mL de vancomicina pode aumentar a produção de biofilme em *S. aureus* com sensibilidade reduzida a vancomicina e resistente a meticilina. Em nosso estudo, dentre os isolados clínicos com aumentada produção de biofilme, dois também são resistentes à meticilina. No entanto, o estudo de Hsu foi conduzido com apenas duas linhagens, podendo essa resposta ser característica específica de tais linhagens. Conforme mostraram os nossos dados, o aumento ou a redução da produção de biofilme induzido por vancomicina parece depender de características específicas de cada linhagem, não sendo possível generalizar o efeito para todos os membros da espécie.

É interessante ressaltar que as amostras de referência (ATCCs), não mostraram alteração significativa na produção de biofilme após exposição à vancomicina, enquanto algumas linhagens clínicas mostraram respostas diferentes, umas aumentando e outras diminuindo a produção de biofilme. Os isolados clínicos sofreram a pressão seletiva natural de agentes antimicrobianos durante a infecção sanguínea, diferentemente das amostras de referência. Entretanto, estas últimas foram mais influenciadas pelo tratamento com subdosagem de vancomicina, com maior resistência à morte pelo sangue total, sugerindo que os mecanismos envolvidos na formação de biofilme não estão relacionados à capacidade de resistir à morte por leucócitos.

A patogênese de *S. aureus* é complexa e envolve a expressão de produtos de muitos genes, incluindo as adesinas de superfície, exoproteínas, e toxinas. Muitos fatores de virulência desse microrganismo são controlados por um locus principal regulador chamado regulador acessório A estafilocócico (SarA). Em estudo realizado por ABDELHADY et al. (2014), foram provocadas mutações nos genes SarA de linhagem de *S. aureus*, com isso, foi identificado que as linhagem mutantes produziram menos biofilme do que as selvagens, provando assim o potencial de regulação de biofilme por SarA. Nesse estudo foi relatado que esse gene regula positivamente a produção de biofilme, entre

outros fatores de virulência de *S. aureus* quando exposto a dosagens subletais de vancomicina. Pacientes em hemodiálise estão constantemente sujeitos a tais dosagens, podendo ser esse um dos motivos de constantes bacteremias e infecções recorrentes.

Além de ser uma forma de escape do sistema imune, o biofilme também provoca aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos. Em estudo realizado no hospital das clínicas de Porto Alegre por Antunes et al., (2011), foram isolados de cateteres venosos centrais espécies de estafilococos que foram classificadas em fortes, moderadas, fracas e não produtoras de biofilme. Após a classificação, foi medida a CIM para vancomicina das espécies em sua forma planctônica e em biofilme. Foi relatado que quanto maior a produção de biofilme da espécie, maior o CIM para combater esse microrganismo. Foi relatado, também, que quanto maior a produção, maior a diferença entre a relação da CIM planctônica e a CIM em biofilme.

Em 2011, Mirani & Jamil observaram que uma amostra de VISA, apresentava aumentada capacidade de formação de biofilme quando testada na presença de vancomicina (14 µg/mL), por 72 horas. Em outro estudo, Zarpellon e colaboradores, em 2015, relataram que linhagens mais resistentes a vancomicina possuem capacidade maior de produção de biofilme, indicando relação entre a susceptibilidade e a formação do biofilme. Nossos experimentos mostraram que subdosagens de vancomicina diminuem a susceptibilidade de *S. aureus* e também pode aumentar a produção de biofilme em algumas linhagens, sendo esses importantes fatores de virulência em bacteremias e infecções crônicas relacionadas a cateteres, principalmente em pacientes em hemodiálise.

5.5. Subdosagem de vancomicina aumenta a resistência de *S. aureus* a ação bactericida dos leucócitos.

O ensaio com sangue total oferece várias vantagens em relação a testes que utilizam PMN isolados, pois os procedimentos de isolamento não são necessários, reduzindo o tempo de execução do experimento e também a possibilidade de ativação inapropriada das células. Além disso, uma vez que as

células são mantidas no seu ambiente nativo, todas as vias de sinalização intercelular mediadas por citocinas são preservadas e fatores solúveis, tais como o sistema complemento e imunoglobulinas são mantidos (DEFORGE et al., 2000).

A atividade bactericida do sangue total foi avaliada frente a quatro amostras de *S. aureus* (duas de referência: ATCC 29213 e ATCC 33591 e duas isoladas de bacteremias: 101 e 198) em dois experimentos independentes. O tratamento com subdosagem de vancomicina aumentou a resistência das amostras de *S. aureus* à ação bactericida do sangue no tempo de 60 minutos (figura 9). Neste ponto, a mediana da porcentagem de células viáveis foi 21,6 vs 63,6 para o controle e a amostra tratada com vancomicina, respectivamente ($p=0,008$).

Em uma análise individual, foi observado que as linhagens de referência apresentaram efeitos mais significativos de resistência à ação do sangue total no tempo de 60 minutos (figura 10). A amostra ATCC 29213 sensibilizada pelo antimicrobiano apresentou redução de 51,5% de células viáveis versus 86,52% de redução no controle. A linhagem ATCC 33591 apresentou o mesmo perfil, exibindo redução na contagem de células viáveis de 46,56%, após tratamento com vancomicina, e 82,4% no controle. Efeito menos notável, embora com mesmo perfil de maior resistência à ação do sangue total, foi encontrado para a amostra clínica 101, que apresentou redução de 30,66% no número de células viáveis após sensibilização com vancomicina, contra 56,66% de redução na contagem de viáveis do controle. Na amostra clínica 198 não observamos diferenças entre os tratamentos, uma vez que as reduções nas contagens de viáveis foi de 45,18% vs 48,97% para a amostra tratada e a controle, respectivamente.

Outros estudos também relataram que linhagens de *S. aureus* quando em contato com doses subletais de vancomicina, podem expressar alterações na sua parede celular, como aumento na espessura (comum em linhagens VISA), que além de aumentar a resistência a antimicrobianos, altera a produção de capsula e expressão de proteína A, pode diminuir a ativação da

resposta imune inata, podendo ser um dos fatores causadores de infecções persistentes por linhagens de *S. aureus* (CUI et al., 2006, Howden et al, 2008).

Méhes et al (2012) relataram que cepas hVISA, bem como MRSA são mais resistentes do que as MSSA à morte por PMN na presença de baixas concentrações de soro (1 e 2,5%). Os autores propõem que as mudanças estruturais na parede celular de hVISA e MRSA, que podem estar relacionadas com a resistência a antibióticos, também podem promover um aumento da resistência bacteriana à opsonofagocitose e morte por fagócitos. As amostras utilizadas em nosso trabalho não são VISA, mas o tratamento por 5 dias consecutivos com dose subterapêutica de vancomicina elevou a CIM, e supondo a ocorrência de alterações similares na parede celular àquelas documentadas para VISA e hVISA, é provável que o efeito de inibição da fagocitose esteja relacionada às alterações na superfície do microrganismo. É preciso considerar que nosso ensaio foi conduzido em sangue total, de forma que outras células além dos PMN podem ter participado do processo de fagocitose, além de possível ação de fatores humorais.

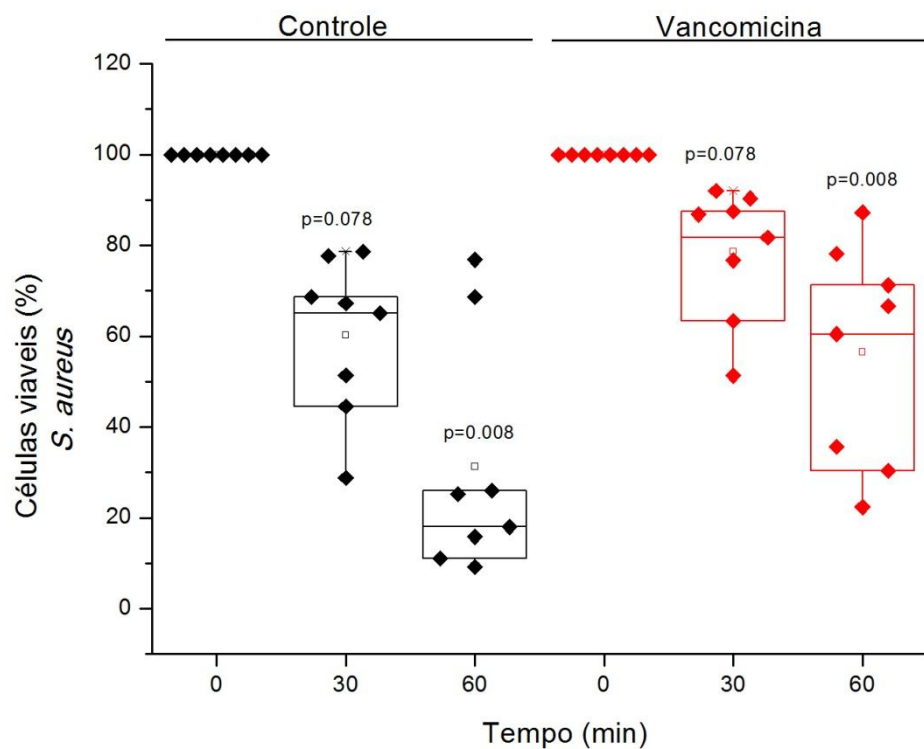


Figura 9: Atividade bactericida do sangue total contra *S. aureus* cultivado por 5 dias consecutivos em meio contendo subdosagem de vancomicina. Dados de experimentos independentes plotado sem gráfico do tipo *boxplot* (mediana e quartis das % de células viáveis). Controle sem exposição ao antimicrobiano. Teste não paramétrico *Wilcoxon Signed Ranks Test* com $p<0,05$.

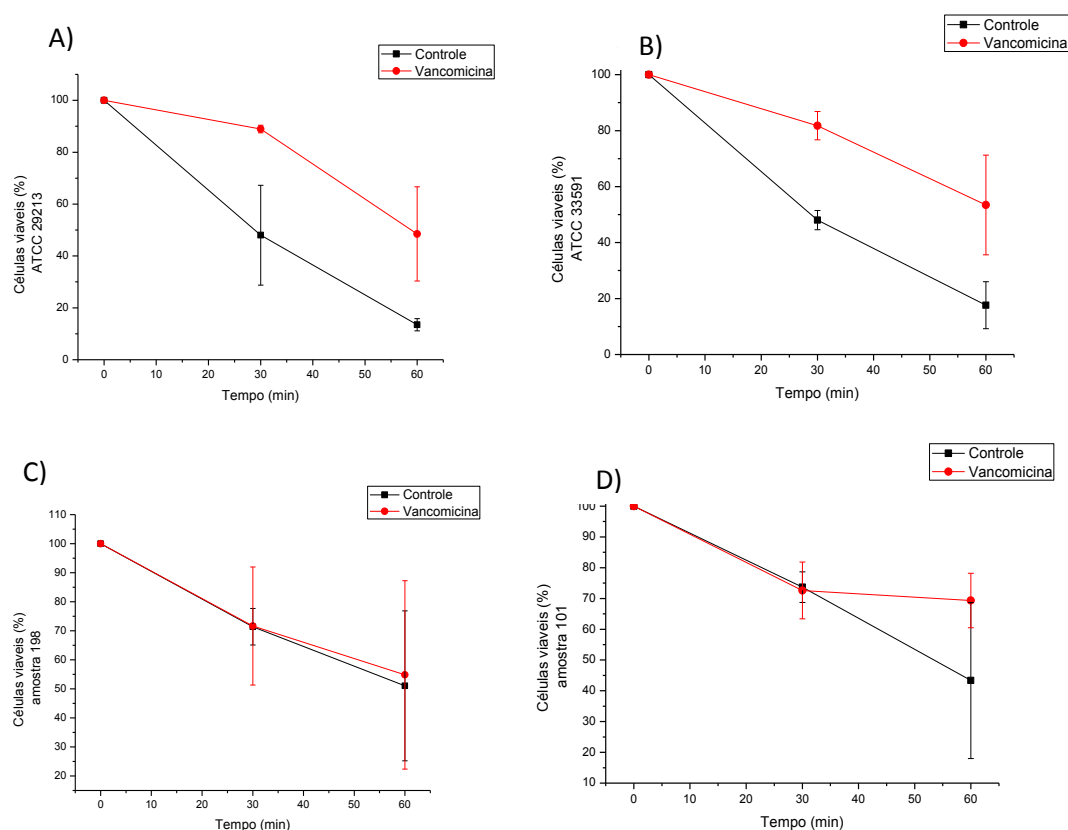


Figura 10: Atividade bactericida do sangue total contra *S. aureus* cultivado por 5 dias consecutivos em meio contendo subdosagem de vancomicina. Os dados são expressos em % de células viáveis (média e desvio padrão) nos tempos de 30 e 60 minutos. O controle é representado pela mesma amostra bacteriana cultivada na ausência do antimicrobiano. (A) ATCC 29213; (B) ATCC 33591; (C) amostra clínica 101; (D) amostra clínica 198.

Pacientes com doença renal crônica e em tratamento hemodialítico estão constantemente expostos a doses subterapêuticas de vancomicina. Esta subdosagem apresenta limitado efeito contra as linhagens de *S. aureus* em fase exponencial de crescimento, sendo incapaz de eliminar o microrganismo e provocando alterações neste, que é o principal patógeno isolado de bacteremias nos pacientes em hemodiálise. Em resumo, dentre as mudanças provocadas, pode-se inferir que a subdosagem de vancomicina diminui a susceptibilidade de *S. aureus* ao glicopeptídeo e à daptomicina, aumenta a resistência à ação bactericida dos leucócitos e altera a produção de biofilme de forma diferenciada em algumas linhagens. Tais alterações podem estar ligadas

a mudanças estruturais na parede celular da bactéria, como aumento na sua espessura dificultando a ação dos antimicrobianos e do sistema imune.

Os resultados obtidos nesse estudo ressaltam a importância do monitoramento dos níveis séricos de vancomicina para evitar a exposição do paciente às subdosagens, bem como a importância da escolha correta do antimicrobiano para o tratamento empírico. Tais medidas podem propiciar redução dos agravos potenciais para os pacientes e também redução do risco de surgimento de resistência bacteriana.

6. CONCLUSÕES:

- 1) Linhagens de *S. aureus* após exposição à dosagens subterapêuticas de vancomicina podem sofrer interferência limitada quando estão em fase exponencial de crescimento
- 2) A exposição a doses subterapêuticas de vancomicina diminuiu a sensibilidade de *S. aureus* à vancomicina e daptomicina, mas não à oxacilina.
- 3) Resposta diferenciada de produção de biofilme ocorreu nos isolados clínicos de *S. aureus* expostos à doses subterapêuticas de vancomicina.
- 4) A resistência de *S. aureus* à ação bactericida dos leucócitos é aumentada após exposição das linhagens a doses subterapêuticas de vancomicina

7. REFERÊNCIAS:

ABDELHADY, W. et al. Impact of vancomycin on sarA-mediated biofilm formation: Role in persistent endovascular infections due to methicillin-resistant staphylococcus aureus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 8, p. 1231–1240, 2014.

ABBOTT, K. C., AGODOA, L. Y. Etiology of bacterial septicemia in chronic dialysis patients in the United States. **ClinNephrol.** v. 56, n. 2, p. 124-131, 2001.

AGUADO, J. M. et al. High vancomycin MIC and complicated methicillin-susceptible Staphylococcus aureus bacteremia. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 6, p. 1099–102, jun. 2011.

ANDREWS, M.-M. et al. Recurrent Nonmenstrual Toxic Shock Syndrome: Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 10, p. 1470–1479, 15 maio 2001.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 465–478, 27 maio 2014.

ANTUNES, A. L. S. et al. High vancomycin resistance among biofilms produced by Staphylococcus species isolated from central venous catheters. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 51–55, 2011.

ARAUJO, E.; MOREIRA, E. Avaliação do acesso vascular para hemodiálise em crianças e adolescentes : um estudo de coorte. **J Bras Nefrol**, v. 33, n. 4, p. 422–430, 2011.

ARCIOLA, C. R. et al. Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, p. 5967–5982, set. 2012.

Awad S, Alharbi AE, Alshami I. Exposure of vancomycin-sensitive Staphylococcus aureus to subinhibitory levels of vancomycin leads to upregulated capsular gene expression. **BrJ Biomed Sci.** V. 70,n. 2:p. 58-61. 2013.

BARROS E., MANFRO R.C., THOMÉ F.S., GONÇALVES L.F.S. Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento. **Artmed**, 2006.

BISOGNANO, C. et al. Increased expression of fibronectin-binding proteins by fluoroquinolone-resistant Staphylococcus aureus exposed to subinhibitory levels of ciprofloxacin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 5, p. 906–13, maio 1997.

BISIWE, F. et al. Haemodialysis catheter-related bloodstream infections at

Universitas Academic Hospital , Bloemfontein : should we change our empiric antibiotics ? **South Afr J Infect Dis**, v. 30, n. 1, p. 29–33, 2015.

BOBIN-DUBREUX, S. et al. Clinical Isolate of Vancomycin-Heterointermediate *Staphylococcus aureus* Susceptible to Methicillin and In Vitro Selection of a Vancomycin-Resistant Derivative. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 349–352, 1 jan. 2001.

BOLES, B. R. et al. Identification of Genes Involved in Polysaccharide-Independent *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, p. e10146, 14 abr. 2010.

BHAKDI, S.; TRANUM-JENSEN, J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. **Microbiological reviews**, v. 55, n. 4, p. 733–751, 1991.

BLOEMBERGEN WE, PORT FK: Epidemiological perspective on infections in chronic dialysis patients. **Adv Ren Replace Ther**3: 201-207, 1996.

BRAGA, P. C. Effects of Subinhibitory Concentrations of Seven Macrolides and Four Fluoroquinolones on Adhesion of *Staphylococcus aureus* to Human Mucosal Cells. **Chemotherapy**, v. 40, n. 5, p. 304–310, 1994.

BRAGA, P. C.; SALA, M. T.; SASSO, M. Pharmacodynamic Effects of Subinhibitory Concentrations of Rufloxacin on Bacterial Virulence Factors Pharmacodynamic Effects of Subinhibitory Concentrations of Rufloxacin on Bacterial Virulence Factors. **Journal of antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 5, p. 1013–1019, 1999.

BRAGA, P. C.; PIATTI, G. Favourable Effects of Sub-Mic Rufloxacin Concentrations in Decreasing the Pathogen-Host Cell Adhesion. **Pharmacological Research**, v. 28, n. 1, p. 11–19, jul. 1993.

CARSENTI-ETESSE, H., et al. Effects of subinhibitory concentrations of vancomycin and teicoplanin on adherence of staphylococci to tissue culture plates. **Antimicrob. Agents Chemother**, n. 37, p. 921–923, 1993.

CERCA, N. et al. Effects of growth in the presence of subinhibitory concentrations of dicloxacillin on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* biofilms. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8677–82, 2005.

CHANG, C. et al. An investigation of vancomycin minimum inhibitory concentration creep among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from pediatric patients and healthy children in Northern Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, p. 1–8, jun. 2015.

COLLINS, A. J., FOLEY, R. N., HERZOG, C., et al. US Renal Data System 2012 annual data report. **Am J Kidney Dis**. v. 61, n. 1(suppl 1), p. e1 - e480, 2013.

CORESH, J. et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. **JAMA**: v. 298, n. 17, p. 2038–2047, 2007.

CUI, L. et al. Novel Mechanism of Antibiotic Resistance Originating in Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 428–438, 1 fev. 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S125. **Clin and Laborat Stand Instit.** CLSI, 2015.

DEFORGE, L. E.; BILLECI, K. L.; KRAMER, S. M. Effect of IFN- γ on the killing of *S. aureus* in human whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 245, n. 1-2, p. 79–89, nov. 2000.

DELEO, F. R.; DIEP, B. A.; OTTO, M. Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. **Infectious disease clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 17–34, 2009.

DAL SASSO, M. et al. Gemifloxacin: effects of sub-inhibitory concentrations on various factors affecting bacterial virulence. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, n. 4, p. 325–333, abr. 2003.

DASTGHEYB, S. S. et al. Role of phenol-soluble modulins in formation of *Staphylococcus aureus* biofilms in synovial fluid. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 7, p. 2966–2975, 2015.

DEMBER, L. M. et al. Objectives and design of the hemodialysis fistula maturation study. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 63, n. 1, p. 104–112, 2014.

DOGRA, G. K. et al. Prevention of tunneled hemodialysis catheter-related infections using catheter-restricted filling with gentamicin and citrate: a randomized controlled study. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 13, n. 8, p. 2133–2139, 2002.

DULON, M. et al. MRSA carriage among healthcare workers in non-outbreak settings in Europe and the United States: a systematic review. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 363, 2014.

ESMANHOTO, C. G. et al. Microrganismos isolados de pacientes em hemodiálise por cateter venoso central e evolução clínica relacionada. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 26, n. 5, p. 413–420, 2013.

ELEFTHERIADIS, T. et al. Infections in hemodialysis: A concise review - part 1: Bacteremia and respiratory infections. **Hippokratia**, v. 15, n. 1, p. 12–17, 2011.

FARIAS, A. L. N.; FROTA, C. C. *Staphylococcus aureus* (MRSA and CA-MRSA

strains) in South America: comparative review to emergence of strains in North America and worldwide. **Revista de Medicina da UFC**, v. 55, n. 2, p. 39, 31 dez. 2015.

FOSTER, T. J. Immune evasion by staphylococci. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 948–958, dez. 2005.

FOSTER, T. J. et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 49–62, 16 dez. 2014.

GARCIA, C. P. **Fatores associados à aquisição de *Staphylococcus aureus***. 2013.104f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2013.

GAUNA, T. **Infecção de corrente sanguínea em pacientes renais crônicos com cateter venoso central**. 2013. 83 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento) - Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande. 2013.

GONEAU, L. W. et al. Infection Pathogenesis through Modulation of Bacterial Virulence and Host Immunity. **mBio**, v. 6, n. 2, p. 1–13, 2015.

GOULD, I. M. Clinical relevance of increasing glycopeptide MICs against *Staphylococcus aureus*. **Inter J Antimicrob Agents**, v. 31, p. 1–9, abr. 2008.

GULLBERG, E. et al. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 7, p. 1–9, 2011.

GRESHAM, H. D. et al. Survival of *Staphylococcus aureus* Inside Neutrophils Contributes to Infection. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 7, p. 3713–3722, 1 abr. 2000.

HOWDEN, B. P., WARD, P. B., CHARLES, P.G., et al. Treatment outcomes for serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility. **Clin Infect Dis**, v. 38, p. 521–528. 2004.

HOWDEN, B. P. et al. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 1, p. 99–139, jan. 2010.

HSU, C.-Y. et al. Vancomycin promotes the bacterial autolysis, release of extracellular DNA, and biofilm formation in vancomycin-non-susceptible *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 236–247, nov. 2011.

ISOPPO, C. S. Pacientes em hemodiálise ambulatorial: protocolo de administração e monitoramento de níveis séricos de vancomicina. 2013.66f. Dissertação (mestrado em medicina e ciências da saúde) - programa de pós-graduação em medicina e ciências da saúde, pontifícia universidade católica do rio grande do Sul. Rio Grande do Sul, 2013.

JONES, T. et al. Failures in Clinical Treatment of *Staphylococcus aureus* Infection with Daptomycin Are Associated with Alterations in Surface Charge, Membrane Phospholipid Asymmetry, and Drug Binding. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 269–278, 1 jan. 2008

KAPLAN, J. B. et al. Low Levels of beta -Lactam Antibiotics Induce Extracellular DNA Release and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. **mBio**, v. 3, n. 4, p. 2–9, 2012.

KERNODLE, D. S. et al. Growth of *Staphylococcus aureus* with Nafcillin In Vitro Induces -Toxin Production and Increases the Lethal Activity of Sterile Broth Filtrates in a Murine Model. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 2, p. 410–419, 1 ago. 1995.

LAI, C.-F. et al. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is associated with higher all-cause mortality in hemodialysis patients. **Clin j Am SocNepho**. v. 6, n. 1, p. 167–174, 2011.

LATIMER, J.; FORBES, S.; MCBAIN, A. J. Attenuated Virulence and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* following Sublethal Exposure to Triclosan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3092–3100, 1 jun. 2012.

LEITE, É.M.D., et al., Perfil clínico de pacientes submetidos à hemodiálise. Departamento de Enfermagem, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, n. 19, p. 1988-3439, Nov. 2013

LEVEY A. S., et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). **Kidney Int**. n. 67, v. 6, p. 2089-2100, 2005.

LAFRANCE, J.-P. et al. Trends in infection-related hospital admissions and impact of length of time on dialysis among patients on long-term dialysis: a retrospective cohort study. **CMAJ Open**, v. 2, n. 2, p. E109–E114, 2014.

LI, Y. et al. Outcomes of *Staphylococcus aureus* infection in hemodialysis-dependent patients. **Clin J Am SocNepro**, v. 4, n. 2, p. 428–434, 2009.

LOCATELLI, F. et al. Epidemiology of cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease. **Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 18 Suppl 7, p. vii2–i9, 2003.

LUCET, J.C. et al. Prevalence and risk factors for carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at admission to the intensive care unit: results of a multicenter study. **Arch Intern Med**, n. 163, v. 2, p. 181-8, 2003.

MCCOURT, J. et al. Fibronectin-binding proteins are required for biofilm formation by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain LAC. **FEMS Microbiology Letters**, v. 353, n. 2, p. 157–164, abr. 2014.

MARENGO, L. L., et al. Vancomycin: the need to suit serum concentrations in hemodialysis patients. **Braz J Infect Dis**. v. 14(2), p. 203-208. 2010.

MIRANI, Z. A.; JAMIL, N. Effect of sub-lethal doses of vancomycin and oxacillin on biofilm formation by vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 191–195, abr. 2011.

MEHES, L. et al. Phagocytosis and intracellular killing of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 198–203, 2012.

NASSAR, G. M.; AYUS, J. C. Infectious complications of the hemodialysis access. **Kidney International**, v. 60, n. 1, p. 1–13, 2001.

NKF-National Kidney Foundation. K/DOQI Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Disease*. n. 39, p. S1–266, 2002.

MASON, E.O., et al. Vancomycin MICs for *Staphylococcus aureus* vary by detection method and have subtly increased in a pediatric population since 2005. **J. Clin. Microbiol.** v. 47, p. 1628–1630. 2009.

MOISE-BRODER, P. A. et al. Accessory gene regulator group II polymorphism in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. **Clin Infect Dis**.v. 38. p.1700-1705. 2004.

MURRAY, K. P. et al. Early Use of Daptomycin Versus Vancomycin for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia With Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration \geq 1 mg/L: A Matched Cohort Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 11, p. 1562–1569, 1 jun. 2013.

NAIMI, T. S. et al. Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* with phenotypic susceptibility to methicillin in a patient with recurrent bacteremia. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 36, n. 12, p. 1609–12, 15 jun. 2003.

NEGRETTI, C. D.; MENDONÇA, P. G.; CESAR, N. Perfil Epidemiológico de Pacientes Renais Crônicos em Tratamento Conservador em um Hospital Escola do Sul de Minas Epidemiologica.I Profile of Chronic Renal Failure Patients on Conservative Treatment in a Hospital in Southern School of Minas Recebido em no. 2014.

OHLSEN, K. et al. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (hla) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 11, p. 2817–23, nov. 1998.

OTTO, M. P. et al. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 68, n. 7, p. 1524–32, 2013.

PACIFICI, G.; ALLEGAERT, K. Clinical pharmacokinetics of vancomycin in the neonate: a review. **Clinics**, v. 67, n. 7, p. 831–837, 23 jul. 2012.

PEA, F. et al. Prospectively Validated Dosing Nomograms for Maximizing the Pharmacodynamics of Vancomycin Administered by Continuous Infusion in Critically Ill Patients. **Antimic Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 1863–1867, 1 maio 2009.

PELEG, A. Y. et al. Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 199, n. 4, p. 532–6, 15 fev. 2009.

PILLAI, S. K. et al. Development of Reduced Vancomycin Susceptibility in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 8, p. 1169–1174, 15 out. 2009.

RHEE, K. Y., GARDINER, D. F., CHARLES, M. Decreasing in-vitro susceptibility of clinical *Staphylococcus aureus* isolates to vancomycin at the New York Hospital: quantitative testing redux. **Clin. Infect. Dis.**, v. 40, pp. 1705–1706. 2005.

RYBAK, M. J. The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of vancomycin. **Clin infec diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 42 Suppl 1, p. S35–S39, 2006.

RYBAK, M. et al. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: A consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. **Am J of Health-System Pharmacy**, v. 66, n. 1, p. 82–98, 1 jan. 2009.

ROCH, M. et al. Exposure of *Staphylococcus aureus* to subinhibitory concentrations of β -lactam antibiotics induces heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5306–5314, 2014.

RUPP, M. Effect of subinhibitory concentrations of vancomycin, cefazolin, ofloxacin, L-ofloxacin and D-ofloxacin on adherence to intravascular catheters and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41, n. 2, p. 155–161, 1 fev. 1998.

SASAHARA, T. et al. Pretreatment of *Pseudomonas aeruginosa* with a sub-MIC of imipenem enhances bactericidal activity of neutrophils. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 9, n. 4, p. 297–303, 2003.

SAKOULAS, G., GOLD, H. S., COHEN, R. A., VENKATARAMAN, L., MOELLERING, R., ELIOPOULOS, G.M.: Effects of prolonged vancomycin administration on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a patient with recurrent bacteraemia. **J Antimicrob Chemother.** v. 57, p 699–704. 2006.

SAXENA, A. K., et al. Vascular Access Related Infections in Hemodialysis Patients. Saudi. **J Kidney Dis Transplant.** v.16(1). p.46-71. 2005.

SESSO, R. C., LOPES, A. A. THOMÉ, F. S. et al. Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica 2013 - Análise das tendências entre 2011 e 2013. **J Bras Nefrol.** v.;36(4):p.476-481. 2014.

SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY, M. K.; GROSSART, H.-P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. March, p. 1–13, 2013.

SIERADZKI, K.; TOMASZ, A. Alterations of Cell Wall Structure and Metabolism Accompany Reduced Susceptibility to Vancomycin in an Isogenic Series of Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 24, p. 7103–7110, 15 dez. 2003.

SILVESTRO, E. M. et al. Effects of subinhibitory concentrations of clindamycin on the morphological, biochemical and genetic characteristics of *Bacteroides fragilis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 257, n. 2, p. 189–194, 2006.

SBN - SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Hemodialise. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/publico/hemodialise>> Acesso em: 09 jun 2015.

SHAPIRO, R. S. Antimicrobial-Induced DNA Damage and Genomic Instability in Microbial Pathogens. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 3, p. e1004678, 26 mar. 2015.

SHINEFIELD, H. et al. Use of a *Staphylococcus aureus* Conjugate Vaccine in Patients Receiving Hemodialysis. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 7, p. 491–496, 14 fev. 2002.

SHULER C, GOLPER T.A., BENNET W.M. Prescribing drugs in renal disease.**The Kidney**. Philadelphia, PA, W.B. Saunders Company. p. 2653-2702, 1996.

SMELTZER, S. C., BARE, B. G. **Brunner &Suddarth**. Tratado de Enfermagem Médico-Cirúrgica. Ed. Guanabara. 12ª edição.p. 2404. 2011.

STEWART, P. S.; WILLIAM COSTERTON, J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**, v. 358, n. 9276, p. 135–138, jul. 2001.

STEINKRAUS, G., WHITE, R., FRIEDRICH, L. Vancomycin MIC creep in non-vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), vancomycin-susceptible clinical methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) blood isolates from 2001–05 J. **Antimicrob. Chemother.**, v. 60, pp. 788–794. 2007.

STEVENS, L. A; VISWANATHAN, G.; WEINER, D. E. CKD and ESRD in the Elderly: Current Prevalence, Future Projections, and Clinical Significance. **Adv Chronic Kidney Dis**, v. 17, n. 4, p. 293–301, 2010.

STRYJEWSKI, M. E. et al. Use of Vancomycin or First-Generation Cephalosporins for the Treatment of Hemodialysis-Dependent Patients with Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 2, p. 190–196, 15 jan. 2007.

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891–899, ago. 2007.

SZYBALSKI, W. Gradient plates for the study of microbial resistance to antibiotics. *Bact. Proc.*, n. 36, 1952.

TAYLOR, G., GRAVEL, D., JOHNSTON, L., EMBIL, J., HOLTON, D., PATON, S. Prospective surveillance for primary bloodstream infections occurring in Canadian hemodialysis units. **Infect Control HospEpidemiol.** v. 23(12), p 716-720. 2002.

THI, T. D. et al. Effect of recA inactivation on mutagenesis of *Escherichia coli* exposed to sublethal concentrations of antimicrobials. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 531–538, 1 mar. 2011.

VANDECASTEELE, S. J.; BOELAERT, J. R.; DE VRIESE, A. S. *Staphylococcus aureus* Infections in Hemodialysis: What a Nephrologist Should Know. **Clin J Am SocNephro**, v. 4, n. 8, p. 1388–1400, 1 ago. 2009.

VAN HAL, S. J.; PATERSON, D. L.; LODISE, T. P. Systematic review and meta-analysis of vancomycin-induced nephrotoxicity associated with dosing schedules that maintain troughs between 15 and 20 milligrams per liter. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 2, p. 734–744, 2013.

VIDAILLAC, C. et al. Alternative Mutational Pathways to Intermediate Resistance to Vancomycin in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 1, p. 67–74, 1 jul. 2013.

VITÓRIA, M.P. Monitoramento de vancomicina em pacientes em tratamento hemodialítico com infecções de corrente sanguínea por *staphylococcus* spp. 2015. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) - Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito

Santo. Vitória. 2015.

VOYICH, J. M. et al. Avoid Destruction by Human Neutrophils 1. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 9, p. 3907–3919, 2005.

ZARPELLON, M. N. et al. Survival of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* on hospital surfaces. **Journal of Hospital Infection**, v. 90, n. 4, p. 347–350, 2014.

WONG-BERINGER, A. et al. Vancomycin-associated nephrotoxicity: a critical appraisal of risk with high-dose therapy. **Int J Antimic Agents**, v. 37, n. 2, p. 95–101, fev. 2011.

ANEXO:

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Efeito de concentração subterapêutica de vancomicina sobre *Staphylococcus aureus*.

Pesquisador: Kênia Valéria dos Santos

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 38640114.3.0000.5060

Instituição Proponente: Centro de Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESPÍRITO SANTO - FAPES

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa de Kênia Valéria dos Santos, professora lotada no Departamento de Patologia do Centro de Ciências da Saúde, UFES.

JUSTIFICATIVA: A Insuficiência Renal Crônica (IRC) se constitui por perda progressiva e normalmente irreversível da filtração glomerular. É necessária a diálise quando os rins não são mais capazes de remover os líquidos e os produtos de degradação urêmicos do corpo. Nesses casos é necessária a cateterização para obter-se imediato acesso a circulação. Devido à necessidade da sua manipulação e manutenção dos cateteres pela equipe médica, pode ocorrer algumas complicações, como infecções, sendo a infecção por *S. aureus* comumente associada a alto índice de morbidade e mortalidade. Vancomicina é um antibiótico de grande utilidade clínica em infecções graves por bactérias Gram positivas. O intervalo de administração recomendado para pacientes com insuficiência renal avançada varia de 7 a 10 dias, no entanto, é necessário seguir os níveis do antibiótico no soro do paciente para adequar melhor as doses e o intervalo de administração. No entanto, apenas alguns hospitais ou serviços têm acesso esse tipo de dosagem, de tal maneira que na maioria das vezes essa adequação é feita baseada em tabelas de ajuste de doses, o que pode acarretar em pacientes com nível plasmático de vancomicina abaixo no do

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES **Município:** VITÓRIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep@ccs.ufes.br

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE/UFES



Continuação do Parecer: 903.454

terapêutico.

OBJETIVO: Investigar os efeitos de vancomicina em doses subterapêuticas sobre alguns aspectos da fisiologia e de fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*.

LOCAL DO ESTUDO: Doadores de sangue saudáveis, com idade entre 18 e 35 anos de idade, entre os estudantes de graduação e pós-graduação vinculados ao departamento de Patologia do CCS-UFES.

INTERVENÇÃO: Serão recrutados 03 doadores de sangue saudáveis, com idade entre 18 e 35 anos de idade, entre os estudantes de graduação e pós-graduação vinculados ao departamento de Patologia do CCS-UFES. O sangue dos doadores será utilizado para obtenção de soro para opsonização bacteriana e para isolamento de neutrófilos para o experimento de fagocitose. Os doadores serão recrutados em 03 momentos distintos, correspondendo às três repetições experimentais. Após assinatura do TCLE serão coletadas 2 amostras de sangue de cada doador (20ml e outra 2 ml) por meio de punção de veia periférica, por técnico de laboratório treinado para executar tal procedimento.

BENEFÍCIOS: Esse estudo trará benefícios aos pacientes em hemodiálise, pois os resultados nos mostrará se as doses subterapêuticas de vancomicina administradas nesses pacientes fazem algum efeito sobre a virulência de *Staphylococcus aureus*.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar os efeitos de vancomicina em doses subterapêuticas sobre alguns aspectos da fisiologia e de fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- Riscos: de acordo com o pesquisador, "A coleta de sangue pode acarretar risco de infecção ao paciente no local de inserção da agulha. Risco que é reduzido significativamente fazendo-se a utilização de técnicas de antisepsia, como o uso de álcool 70% para antisepsia do local onde será feita a coleta, e também o uso de materiais (seringas e agulhas) estéreis e descartáveis."

- Benefícios: de acordo com o pesquisador, "Esse estudo trará benefícios aos pacientes em hemodiálise, pois os resultados nos mostrará se as doses subterapêuticas de vancomicina administradas nesses pacientes fazem algum efeito sobre a virulência de *Staphylococcus aureus*."

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep@ccs.ufes.br

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE/UFES



Continuação do Parecer: 903.454

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pesquisa relevante, com benefícios previstos prevalecendo sobre os riscos. No entanto, para que seja aprovado por este CEP, alguns esclarecimentos precisam ser feitos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- A folha de rosto está adequada
- O projeto de pesquisa está adequado
- O TCLE está adequado
- O orçamento é apresentado de forma adequada

Recomendações:

Antes de submeter ou resubmeter seu projeto de pesquisa para o CEP verifique as recomendações abaixo:

Alguns projetos encaminhados ao CEP têm apresentado problemas que tem dificultado a apreciação dos mesmos, atrasando a emissão do parecer e sobrecarregando o colegiado com o grande número de projetos com pendências. Desta forma, o CEP, vem por meio desse encaminhar algumas recomendações, baseadas na RESOLUÇÃO CNS Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012 a serem observadas para agilizar a avaliação dos projetos.

1. De acordo com a referida resolução, XI.2 "Cabe ao pesquisador: a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa", ou seja, **NENHUMA ETAPA DA PESQUISA QUE ENVOLVA QUALQUER CONTATO COM OS PARTICIPANTES OU SEUS DADOS PODE SER INICIADA ANTES DA APROVAÇÃO DO CEP.**
2. A res. CNS 466/12 dispõe: "V – DOS RISCOS E BENEFÍCIOS; Toda pesquisa com seres humanos envolve risco em tipos e gradações variados", portanto o pesquisador deverá prever quais situações poderão atingir física ou mentalmente um sujeito. Questionários, por exemplo, podem demandar tempo, causar constrangimento, fazer a pessoa a reviver experiências que podem causar sofrimento psíquico, causar ansiedade, expor informações de um grupo ou comunidade específica, etc. Assim o pesquisador deverá, em todo tipo de projeto, relatar os possíveis riscos mesmo que mínimos, e também as providências e cautelas a serem empregadas para evitar e/ou reduzir os riscos citados.
3. O cronograma deve prever o tempo para os trâmites no CEP. Deve-se considerar a possibilidade do projeto não ser aprovado na primeira avaliação e possuir pendências, além do calendário de reuniões. Dessa forma, o projeto depois de adaptado terá que ser novamente avaliado. Isso pode

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

UF: ES

Telefone: (27)3335-7211

Município: VITORIA

CEP: 29.040-091

E-mail: cep@ccs.ufes.br

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE/UFES



Continuação do Parecer: 903.454

acarretar em atrasos. Assim, nunca deixe para submeter o projeto, contanto com a aprovação na primeira avaliação.

4. Cumprir com rigor as exigências da Res. CNS 466/12, IV, que trata do Consentimento Livre e Esclarecido. Foi disponibilizado um modelo de TCLE pelo CEP – CCS/UFES a fim de auxiliar na elaboração do referido documento.

5. Verificar se o projeto está sendo vinculando ao CCS, pois caso contrário o projeto pode ser encaminhado para outro CEP/UFES.

6. A Folha de Rosto que deverá ser digitalizada e anexada ao protocolo será gerada pela plataforma. Não usar o modelo disponível no site do CONEP.

7. Caso tenha alguma dificuldade em utilizar a Plataforma Brasil (como inclusão de anexo, etc), sugerimos mudar de navegador.

8. Informar e comprovar a existência de Biorrepositório ou Biobanco. A não comprovação inviabiliza a aprovação do projeto.

9. Caso o acesso aos participantes ocorra em local diferente da instituição proponente, uma carta de anuência assinada pelo responsável por este local precisa ser apresentada — por exemplo, hospital, unidade de saúde, escola, asilo, creche, etc.

10. Caso no projeto conste o uso de dados secundários, como prontuários médicos ou outros bancos de dados do tipo, uma carta de anuência assinada pelo responsável pelos dados precisa ser apresentada. Neste caso, ainda é obrigatório a apresentação de um termo de sigilo, privacidade e confidencialidade assinado pelo pesquisador responsável pelo projeto proposto.

11. O orçamento detalhado precisa ser apresentado, independentemente se o projeto caracteriza-se como “financiamento próprio” ou não.

ALGUNS DOCUMENTOS IMPORTANTES

- Resolução CNS nº 466/12 — diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos

<http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>

- Resolução CNS nº 441/11 — armazenamento e utilização de material biológico humano com finalidade de pesquisa (Biorrepositório ou Biobanco).

<http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2011/Reso441.pdf>

- Modelo para elaboração do TCLE preparado pelo CEP/CCS/UFES

<http://ccs.ufes.br/sites/ccs.ufes.br/files/Modelo%20de%20TCLE.pdf>

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep@ccs.ufes.br

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES



Continuação do Parecer: 903.454

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram adequadas e o projeto está de acordo com as exigências da resolução 466/12 do CNS.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

VITORIA, 09 de Dezembro de 2014

Assinado por:
Cynthia Furst Leroy Gomes Bueloni
(Coordenador)

Endereço: Av. Marechal Campos 1468
Bairro: S/N
UF: ES Município: VITORIA
Telefone: (27)3335-7211

CEP: 29.040-091

E-mail: cep@ccs.ufes.br